

Université de Sherbrooke

**L'impact du kétoprofène et de son dérivé lié au sulfure d'hydrogène sur la muqueuse
intestinale immature humaine**

Par
Marie-Pier Thibault
Programme de biologie cellulaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.) en biologie cellulaire

Sherbrooke, Québec, Canada
Mai 2017

Membres du jury d'évaluation
Jean-François Beaulieu, Programme de biologie cellulaire
Caroline Saucier, Programme de biologie cellulaire
Sheela Ramanathan, Programme d'immunologie

© Marie-Pier Thibault, 2017

L'impact du kétoprofène et de son dérivé lié au sulfure d'hydrogène sur la muqueuse intestinale immature humaine

Par

Marie-Pier Thibault

Département d'anatomie et de biologie cellulaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.) en biologie cellulaire, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

L'utilisation des anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) est associée à une multitude d'effets secondaires néfastes sur le tube digestif de l'embryon, du fœtus et du nouveau-né. En effet, des études antérieures du laboratoire ont permis de mettre en évidence les effets néfastes de l'administration des AINS, comme l'indométacine (Perron et *al.*, 2013), sur le profil d'expression de plusieurs groupes de gènes dans la muqueuse intestinale immature humaine. Ainsi, dans un effort de minimiser ces effets néfastes, des dérivés de ces drogues exploitant les effets cellulaires bénéfiques connus de gaz biologiquement actifs, comme le sulfure d'hydrogène (H_2S), ont été développés, notamment l'ATB-352, un dérivé de kétoprofène.

Le but de cette étude est de déterminer les effets du kétoprofène et de son dérivé, ATB-352, sur les voies métaboliques de la muqueuse intestinale immature humaine précédemment identifiées comme étant significativement altérées en réponse à l'indométacine (Perron et *al.*, 2013), en culture organotypique. Le niveau d'expression des gènes impliqués dans ces voies ont été mesurés par RT-qPCR suite à un traitement de 48 heures.

L'analyse de l'expression du messenger de *COX-2* des différentes cultures étudiées a permis d'observer deux modèles de réponse distincts, soit un groupe de «répondeurs» où l'expression du messenger de *COX-2* était augmentée et un groupe de «non-répondeurs» où celle-ci était invariable en réponse au kétoprofène. Les effets négatifs de l'indométacine observés antérieurement sur l'expression des oxydoréductases (*DUOX2*, *NOS2* et *SOD2*) n'ont pas été retrouvés avec le groupe répondeur de kétoprofène. De plus, aucun changement significatif n'a pu être observé entre les effets du dérivé ATB-352 et du kétoprofène seul.

Les résultats obtenus suggèrent des effets secondaires sur la muqueuse intestinale immature humaine moins néfastes suite à l'administration du kétoprofène comparativement à l'indométacine, possiblement dû à son rôle de double inhibiteur des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'acide arachidonique. Toutefois, ces résultats n'ont pas permis de démontrer l'efficacité du H_2S , possiblement dû à son épuisement dans le milieu de culture.

Mots clés : Anti-inflammatoires non-stéroïdiens, kétoprofène, H_2S , muqueuse intestinale immature humaine, gènes de référence.

TABLE DES MATIÈRES

I- INTRODUCTION	1
1. Entérocolite nécrosante néonatale.....	1
1.1 Diagnostic de l'ENN	1
1.2 Pathogénèse de l'ENN.....	2
2. Anti-inflammatoires non-stéroïdiens	3
2.1 Utilisation des anti-inflammatoires non-stéroïdiens en clinique	4
2.2 Effets secondaires de l'administration des anti-inflammatoires non-stéroïdiens	5
2.3 Étude antérieure de l'impact des anti-inflammatoires non-stéroïdiens sur la muqueuse intestinale immature humaine	6
2.4 Dérivés d'anti-inflammatoires non-stéroïdiens	7
2.4.1 Dérivés d'anti-inflammatoires non-stéroïdiens liés à l'oxyde nitrique	7
2.4.2 Dérivés d'anti-inflammatoires non-stéroïdiens liés au sulfure d'hydrogène.....	8
2.5 Le kétoprofène.....	8
2.5.1 Dérivé du kétoprofène	9
3. Utilisation de la culture organotypique comme modèle expérimental.....	10
4. Hypothèse et objectifs	11
II- MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	13
1. Origine des tissus utilisés	13
2. Culture organotypique.....	13
2.1 Origine des produits utilisés	13
2.2 Doses utilisées	13

2.3 Culture	14
3. Extraction d'ARN, traitement DNase et transcription inverse.....	15
4. qPCR	15
5. Analyse des données	15
5.1 Sélection des gènes de référence appropriés	15
5.1.1 Coefficient de variation (%CV).....	16
5.1.2 GeNorm	17
5.1.3 NormFinder.....	18
5.1.4 BestKeeper.....	18
5.1.5 RefFinder	19
5.1.6 Classement cumulatif.....	19
5.2 Expression des gènes.....	20
III- RÉSULTATS.....	21
1. Sélection de gènes de référence adéquats	21
1.1 Profil d'expression des candidats investigués pour gènes de référence	21
1.2 Coefficient de variation (%CV)	21
1.3 Analyse GeNorm	23
1.4 Analyse NormFinder	25
1.5 Analyse BestKeeper	25
1.6 Analyse RefFinder.....	27
1.7 Sommaire des analyses.....	28
2. Évaluation des effets directs du kétoprofène sur l'expression génique de la muqueuse intestinale immature humaine comparativement à ceux précédemment observés avec l'indométacine	29
2.1 Deux modèles de réponse.....	32

3. Impact de l'apport de l'H ₂ S par le dérivé ATB-352 sur l'expression génique de la muqueuse intestinale immature humaine	35
IV- DISCUSSION	38
1. Sélection des gènes de référence appropriés pour la culture organotypique d'intestins fœtaux humains traités aux anti-inflammatoires non-stéroïdiens	38
2. Évaluation des effets directs du kétoprofène et de son dérivé lié à l'H ₂ S sur la muqueuse intestinale immature humaine	39
2.1 Impact du kétoprofène sur la muqueuse intestinale immature humaine	41
2.2 Comparaison des effets du kétoprofène à ceux précédemment caractérisés de l'indométacine sur la muqueuse intestinale immature humaine.....	43
2.3 Impact local de l'apport d'H ₂ S par le dérivé ATB-352.....	46
V- CONCLUSION	48
LISTE DES PUBLICATIONS	49

LISTE DES TABLEAUX

I- INTRODUCTION

Tableau 1 : Critères de Bell pour la classification des stades de l'entérocolite nécrosante .. 2

II- MATÉRIEL ET MÉTHODES

Tableau 2 : Caractéristiques et séquences des différents gènes de référence étudiés 16

Tableau 3 : Liste des amorces utilisées dans cette étude 17

III- RÉSULTATS

Tableau 4 : Valeurs obtenues par la méthode de comparaison des coefficients de variation..... 23

Tableau 5 : Données brutes de l'analyse par le logiciel BestKeeper 27

Tableau 6 : Classement cumulatif des 10 gènes de référence candidats 29

LISTE DES FIGURES

I- INTRODUCTION

Figure 1 : Mécanisme d'action des anti-inflammatoires non-stéroïdiens	4
Figure 2 : Structure chimique du kétoprofène	9
Figure 3 : Mécanisme proposé de la relâche du sulfure d'hydrogène (H ₂ S) et du kétoprofène à partir du dérivé ATB-352 suite à son administration orale	10

II- MATÉRIEL ET MÉTHODES

Figure 4 : Explants intestinaux immatures humains	14
---	----

III- RÉSULTATS

Figure 5 : Profil d'expression des 10 candidats investigués comme gènes de référence	22
Figure 6 : Stabilité de l'expression des gènes de référence candidats évaluée par le logiciel GeNorm	24
Figure 7 : Stabilité de l'expression des gènes de référence candidats évaluée par le logiciel NormFinder	26
Figure 8 : Stabilité de l'expression des gènes de référence candidats évaluée par l'outil-web RefFinder	28
Figure 9 : Comparaison des effets différentiels de l'indométacine et du kétoprofène sur les marqueurs de l'activité oxydoréductase, la phosphorylation oxydative, la réponse inflammatoire et la perméabilité intestinale sur la muqueuse intestinale immature humaine	31
Figure 10 : Évaluation de la réponse au traitement des différentes cultures selon l'expression du messenger de <i>COX-2</i>	33
Figure 11 : Comparaison des effets différentiels des deux groupes de réponse du kétoprofène sur les marqueurs de l'activité oxydoréductase, la phosphorylation oxydative, la réponse inflammatoire et la perméabilité intestinale sur la muqueuse intestinale immature humaine	34

Figure 12 : Évaluation de l'effet du H₂S sur les marqueurs de l'activité oxydoréductase, la phosphorylation oxydative, la réponse inflammatoire et la perméabilité intestinale sur la muqueuse intestinale immature humaine en fonction des deux groupes de réponse établis 36

Figure 13 : Évaluation des effets du H₂S sur les gènes impliqués dans ses fonctions cibles théoriques 37

IV- DISCUSSION

Figure 14 : Mécanisme d'action de l'indométacine et ses effets sur la synthèse des leucotriènes 45

Figure 15 : Mécanisme d'action de la double inhibition de la synthèse des prostaglandines et des leucotriènes par le kétoprofène 45

LISTE DES ANNEXES

Annexe I : Liste des publications et communications de l'étudiante

Annexe II : *Ingenuity pathway analysis* des fonctions cellulaires, moléculaires et physiologiques modulées par l'indométacine sur la muqueuse intestinale immature humaine (tiré de Perron et *al.*, 2013).

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA : Acide arachidonique
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire
AINS : Anti-inflammatoire non-stéroïdien
ATP : Adénosine triphosphate
COX : Cyclo-oxygénases
Ct : *Cycle threshold* (cycle seuil)
DMSO: Diméthylsulfoxyde
EGF : *Epidermal growth factor*
ENN : Entérocolite nécrosante néonatale
H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
H₂S : Sulfure d'hydrogène
LOX : Lipoxygénases
LTB₄: Leucotriène B₄
NF : *Normalization factor*
NO : Oxyde nitrique
NO-NSAIDs : Dérivé d'anti-inflammatoires non-stéroïdiens lié à l'oxyde nitrique
PCA : Persistance du canal artériel
PGE₂ : Prostaglandines E₂
ROS : Dérivés réactifs de l'oxygène
RT-qPCR : Réaction en chaîne par polymérase en temps réel
SIP : Perforation intestinale spontanée
TBZ : 4-hydroxythiobenzamide

*Je dédie ce mémoire à ma famille qui n'a jamais
cessé de m'encourager bien que mon domaine
d'études ait toujours été un peu flou pour eux.*

REMERCIEMENTS

Je tiens, tout d'abord, à remercier mon directeur de recherche, Jean-François Beaulieu, pour son écoute, son support et sa passion.

J'aimerais également remercier les deux assistants de recherche du laboratoire, soit Éric Tremblay pour son aide, ses nombreux conseils et son soutien, ainsi qu'Elizabeth Herring simplement pour sa bonne humeur et les nombreuses discussions que nous avons eues!

Finalement, je tiens aussi à remercier les professeures Caroline Saucier du département d'anatomie et de biologie cellulaire ainsi que Sheela Ramanathan du département de pédiatrie d'avoir accepté de réviser ce mémoire.

Merci.

I- INTRODUCTION

1. Entérocolite nécrosante néonatale

Décrite pour la première fois en 1965 par Mizrahi et ses collaborateurs (Mizrahi et *al.*, 1965), l'entérocolite nécrosante néonatale (ENN) est aujourd'hui considérée comme l'une des maladies gastro-intestinales les plus dévastatrices, mais aussi la plus commune chez les nouveau-nés prématurés, affectant près de 10% des nouveau-nés prématurés de très faible poids (<1500g) (Pierro et Hall 2003) avec une incidence inversement proportionnelle à l'âge gestationnel de l'enfant (Guthrie et *al.*, 2003). Cette entéropathie, caractérisée par l'entrée en nécrose des cellules épithéliales intestinales pouvant mener à des perforations intestinales dans les stades les plus avancés de la pathologie, est associée à des taux significatifs de mortalité oscillant entre 20 et 50%, selon les différentes institutions (Patel et Shah, 2012; Niemarkt et *al.*, 2015). Toutefois, bien que l'entérocolite puisse être contrôlée et traitée chez certains patients, ceux-ci demeurent plus à risques de développer des problèmes digestifs secondaires, tels que le syndrome de l'intestin court, certaines maladies du foie ainsi que des retards neurodéveloppementaux (Henry et Moss 2009; Rees et *al.*, 2007).

1.1 Diagnostic de l'ENN

C'est dans un effort d'uniformité des soins apportés aux nouveau-nés atteints de la pathologie que Bell et son équipe ont mis sur pied le premier système de classification des stades de l'entérocolite nécrosante (Bell et *al.*, 1978). En effet, ceux qu'on appellera plus tard les «critères de Bell» catégorisent les patients atteints selon leurs signes systémiques, leurs signes intestinaux ainsi que leurs signes radiologiques, en 3 stades différents, soit I-Soupçonné, II-Défini et III-Avancé, tels que décrits au Tableau 1 (Neu, 1996).

Ce qui contribue à la gravité de la maladie est que ses premiers symptômes cliniques sont difficilement décelables puisqu'ils s'apparentent à plusieurs autres maladies gastro-

intestinales et à certains troubles respiratoires et cardiaques (Henry et Moss 2009). Ainsi, la confirmation du diagnostic de l'entérocolite nécrosante néonatale est souvent effectuée à des stades avancés de la maladie en raison de sa progression insidieuse.

Tableau 1 : Critères de Bell pour la classification des stades de l'entérocolite nécrosante.

STADE	SIGNES SYSTÉMIQUES	SIGNES INTESTINAUX	SIGNES RADIOLOGIQUES
I. Soupçonné			
A	Température instable, apnée, bradycardie	Résidus pré-gavage élevés, légère distension abdominale, sang dans les selles	Normal ou léger iléus
B	Identique à IA	Identique à IA, sang plus important dans les selles	Identique à IA
II. Défini			
A: Légèrement malade	Identique à IA	Identique à IA, absence de bruits intestinaux, sensibilité abdominale	Iléus, pneumatose intestinale
B: Modérément malade	Identique à I, légère acidose métabolique, légère thrombocytopénie	Identique à I, absence de bruits intestinaux, sensibilité abdominale définie, cellulite abdominale, masse du quadrant inférieur droit	Identique à IIA, gaz dans la veine porte, avec ou sans ascite
III. Avancé			
A: Sévèrement malade, intestin intact	Identique à IIB, hypertension, bradycardie, acidose respiratoire, acidose métabolique, coagulation intravasculaire disséminée, neutropénie	Identique à I et II, signes de péritonite généralisée, sensibilité marquée et distension de l'abdomen	Identique à IIB, ascite définie
B: Sévèrement malade, intestin perforé	Identique à IIIA	Identique à IIIA	Identique à IIB, Pneumopéritoine

1.2 Pathogénèse de l'ENN

Bien que la pathophysiologie exacte de l'entérocolite nécrosante n'ait pas encore été complètement élucidée, les cliniciens et chercheurs s'entendent pour dire qu'il s'agit d'une maladie d'origine multifactorielle ayant comme principal facteur de risque la prématurité

(Gordon et Swanson, 2014). Plusieurs autres facteurs de risque ont aussi été proposés, jouant un rôle important dans la pathogénèse de la maladie, notamment l'alimentation entérale et une colonisation bactérienne anormale (Caplan, 2014; Choi, 2014).

Le développement de l'ENN résulte d'une réponse inflammatoire excessive incontrôlée responsable du maintien de l'activité pathologique au centre d'un cercle vicieux. Toutefois, les preuves sont insuffisantes pour conclure une prédominance d'une réponse adaptative de type Th1, Th2 ou encore Th17 (Cho et *al.*, 2016). Un enchaînement de facteurs serait responsable de l'érosion de l'épithélium dans la progression de l'ENN. Une brèche dans la barrière intestinale pourrait être initialement causée par la perturbation des jonctions serrées, encore immatures, par les bactéries de la flore intestinale anormalement en contact avec l'épithélium (Claud 2010). De plus, bien que l'apoptose soit un processus normal du *turnover* des entérocytes, leur apoptose accélérée pourrait participer à l'accentuation des dommages causés à la barrière intestinale. L'étape finale de l'érosion de l'épithélium résulte de la progression de la cascade inflammatoire déclenchée, soit l'entrée en nécrose des cellules épithéliales intestinales, le trait caractéristique de l'ENN (Claud 2010).

L'exposition précoce et continue des nouveau-nés prématurés à une panoplie de traitements, notamment aux anti-inflammatoires non-stéroïdiens, serait aussi associée à une augmentation du risque de développement de l'ENN (Gephart et *al.*, 2012).

2. Anti-inflammatoires non-stéroïdiens

Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) représentent une classe de médicaments aux propriétés analgésiques, antipyrétiques et anti-inflammatoires, permettant le traitement de la douleur, de la fièvre et de l'inflammation. Le mécanisme d'action des AINS classiques passe par l'inhibition de la voie principale du métabolisme de l'acide arachidonique (AA), soit la production de prostaglandines, via l'inhibition de l'activité des cyclo-oxygénases 1 et 2 (COX-1 et COX-2) responsables de la production de prostaglandines et thromboxanes impliquées dans le développement de l'inflammation (Pollard et Earnshaw, 2002), tel que dépeint à la figure 1. Ainsi, c'est l'inhibition de l'activité des isoenzymes COX qui confère aux AINS leur pouvoir anti-inflammatoire.

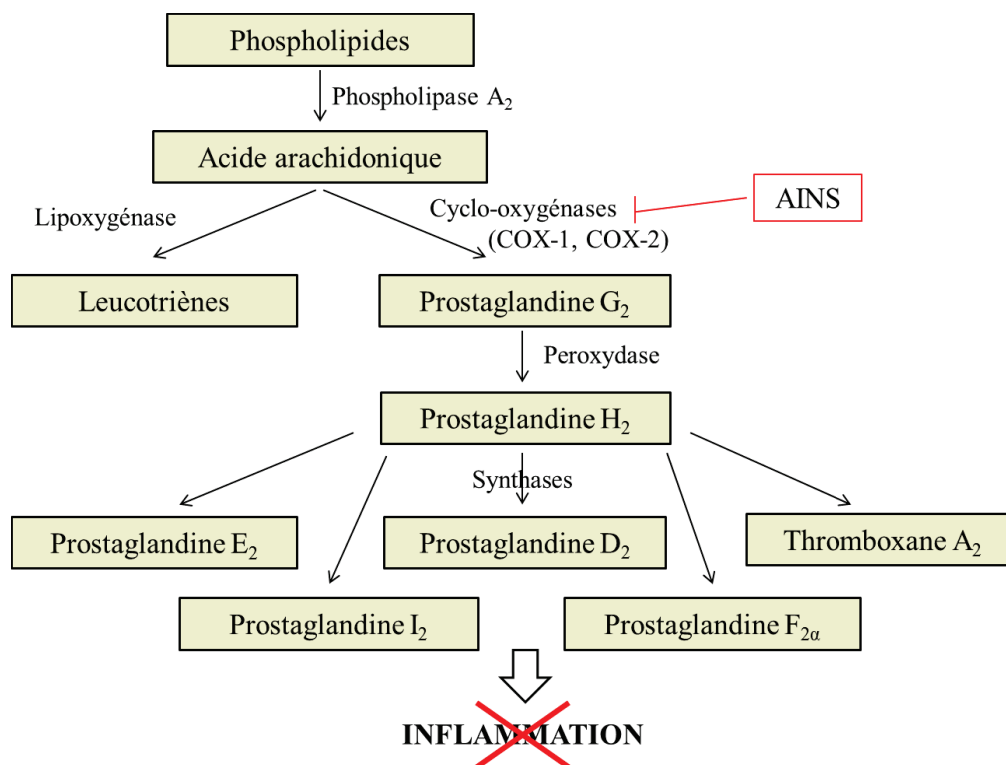


Figure 1 : Mécanisme d'action des anti-inflammatoires non-stéroïdiens. Le mécanisme d'action des anti-inflammatoires non-stéroïdiens passe par l'inhibition des cyclo-oxygénases COX-1 et COX-2, responsables de la production des prostaglandines et leucotriènes qui contribuent au développement de l'inflammation.

2.1 Utilisation des anti-inflammatoires non-stéroïdiens en clinique

Les AINS représentent la classe de médicaments la plus largement prescrite au monde. Outre les usages habituels qu'on lui connaît, comme le traitement de la fièvre ou du mal de tête, cette classe de médicaments est aussi largement utilisée au sein des hôpitaux, notamment en ce qui a trait à la périnatalogie. En effet, depuis les années 70, certains AINS ont fait leurs preuves et sont, encore à ce jour, utilisés de façon efficace aux côtés des agonistes adrénergiques des récepteurs β_2 et des bloqueurs de canaux calciques comme agents tocolytiques. Ces agents permettent l'induction d'une tocolyse, soit une diminution des contractions utérines afin de retarder les menaces d'accouchement prématuré: l'indométacine étant l'agent tocolytique de référence permettant de retarder ces menaces de 48 heures jusqu'à 7 jours (Berkman *et al.*, 2003).

Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens, tels que l'ibuprofène et l'indométacine, sont aussi utilisés dans le traitement de la plus commune des anomalies cardiovasculaires chez les nouveau-nés prématurés, soit la persistance du canal artériel (PCA) (Van Overmeire et Chemtob, 2005). Ce canal artériel, fonctionnel uniquement chez le fœtus, est un vaisseau sanguin reliant le tronc pulmonaire à l'aorte. Bien que sa présence soit nécessaire au cours de la vie fœtale, afin de permettre au sang d'éviter la circulation pulmonaire et ainsi permettre son oxygénation via le placenta, il est indispensable que celui-ci se referme dans les jours suivants la naissance (Dice et Bhatia, 2007). Ainsi, lorsque celui-ci ne parvient pas à se refermer de façon naturelle, l'administration d'AINS permet de faciliter cette fermeture par l'inhibition des prostaglandines responsables du maintien de la «persistance», et ce, de manière efficace dans 60 à 80% des cas traités (Dani, 2011). Dans les cas où l'administration d'AINS ne parvient pas à stimuler la fermeture permanente du canal artériel, celui-ci sera refermé grâce à une ligature chirurgicale.

2.2 Effets secondaires de l'administration des anti-inflammatoires non-stéroïdiens

Il est bien connu que l'administration des anti-inflammatoires non-stéroïdiens, chez l'adulte, est associée à plusieurs effets secondaires, particulièrement gastro-intestinaux, tels que des ulcères, des saignements et même des perforations intestinales, qu'on qualifie d'entéropathies causées par les AINS ou *NSAIDs enteropathy* (Peng et Duggan, 2005). Il n'est donc pas surprenant de voir que ces mêmes AINS sont aussi la cause de plusieurs effets indésirables en périnatalogie. En effet, les AINS administrés aux femmes enceintes pour le traitement de la fièvre, de la douleur ou lorsqu'utilisés comme agents tocolytiques ont le pouvoir de traverser le placenta et sont responsables de plusieurs effets indésirables chez l'embryon, le fœtus et le nouveau-né (Antonucci et *al.*, 2012). En plus d'être associée à un risque accru de fausses couches et de malformations, l'exposition anténatale aux AINS est aussi responsable de plusieurs troubles affectant le cerveau, les reins, les poumons, le système cardiovasculaire et, dans le cas qui nous intéresse, le tube digestif, des nouveau-nés prématurés (Antonucci et *al.*, 2012). Au niveau gastro-intestinal, ces drogues sont associées à une augmentation du risque de développement d'entéropathies, telles que

la perforation intestinale spontanée (SIP) et l'entérocolite nécrosante néonatale, décrite précédemment (Gordon, 2009; Hammers et *al.*, 2015).

En plus des risques liés à l'exposition anténatale, l'administration d'AINS dans le cadre du traitement de la PCA, suite à la naissance, est aussi associée à des effets secondaires gastro-intestinaux similaires. En effet, bien que cette association soit sujette à controverse, plusieurs groupes de recherche ont pu établir un lien direct entre la prise d'AINS, d'indométacine dans la grande majorité des cas, et le développement de l'ENN (Grosfeld et *al.*, 1996; Fujii et *al.*, 2002; Sharma et *al.*, 2010).

2.3 Étude antérieure de l'impact des anti-inflammatoires non-stéroïdiens sur la muqueuse intestinale immature humaine

Le laboratoire du Pr. Beaulieu s'est intéressé à l'impact local de l'administration d'indométacine, soit l'AINS le plus communément utilisé en périnatalogie, sur la muqueuse intestinale immature humaine en utilisant la culture organotypique comme modèle expérimental. Une courbe dose-réponse de l'inhibition des prostaglandines E2 (PGE₂) a d'abord permis d'établir la concentration optimale à utiliser pour la culture organotypique (Perron et *al.*, 2013). La concentration de 1µM d'indométacine a été sélectionnée puisqu'elle représentait une inhibition de plus de 90% de la synthèse de PGE₂ dans l'iléon et le côlon, en plus de représenter la concentration sanguine retrouvée chez les enfants ayant reçu le traitement pour la fermeture du canal artériel (Perron et *al.*, 2013).

L'analyse des résultats obtenus des Puces à ADN par le logiciel *Ingenuity pathway analysis* (IPA) a permis d'observer, qu'en réponse à l'indométacine, plusieurs fonctions métaboliques de la muqueuse intestinale immature humaine sont significativement altérées, notamment plusieurs reliées à l'inflammation, sans grande surprise puisqu'il s'agit d'un anti-inflammatoire, mais aussi, et ce, de manière plus étonnante, au stress oxydatif. En effet, l'indométacine diminue l'expression des gènes reliés à la glycolyse et à la phosphorylation oxydative, tels qu'*ALDOA*, *ENO1* et *NDUFA9*. L'indométacine exerce aussi un effet négatif sur l'expression de certaines oxydoréductases clés, notamment en diminuant l'expression de *DUOX2* et *NOS2* (Perron et *al.*, 2013). Ainsi, le mécanisme

proposé responsable des effets gastro-intestinaux nocifs de l'indométacine serait un dérèglement du métabolisme du glucose et des fonctions mitochondriales causant une augmentation de la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) ainsi qu'une diminution d'ATP résultant en une perturbation de la barrière intestinale (Perron et *al.*, 2013).

2.4 Dérivés d'anti-inflammatoires non-stéroïdiens

C'est dans le but de minimiser les effets secondaires gastro-intestinaux néfastes amenés par l'administration des AINS classiques, qu'un grand nombre de dérivés de ses drogues ont été développés. Parmi ceux-ci, certains dérivés ont exploité les effets connus sur les fonctions cellulaires de gaz biologiquement actifs, appelés gasotransmetteurs ou gasomédiateurs, tels que l'oxyde nitrique (NO) et le sulfure d'hydrogène (H₂S) (Li et *al.*, 2011). Le principe étant qu'un groupement contenant les éléments essentiels à la formation du gaz est ajouté à la composition classique de l'AINS choisi afin qu'une fois administré celui-ci puisse être relâché en réagissant avec les molécules d'H₂O présentes dans le tube digestif (Gemici et *al.*, 2015).

2.4.1 Dérivés d'anti-inflammatoires non-stéroïdiens liés à l'oxyde nitrique

Les dérivés d'AINS liés à l'oxyde nitrique (NO), soit à un groupement tel que le nitroxybutylester, sont parmi les premiers dérivés à avoir vu le jour dans l'espoir de contrebalancer les effets secondaires indésirables de l'administration des AINS (Wallace et *al.*, 1994b). Le NO endogène, produit par les cellules endothéliales, est en fait un médiateur vasodilatateur connu pour jouer un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité et la défense de la muqueuse (Whittle et *al.*, 1989; MacNaughton et *al.*, 1989). Ce sont ces effets cytoprotecteurs qui ont inspiré l'équipe du Pr. Wallace à développer, dans le milieu des années 90, des dérivés *NO-NSAIDs*. Alors que leur efficacité comme anti-inflammatoires, soit comme inhibiteurs de COX, est comparable à celle des AINS classiques, les dérivés liés au NO causent significativement moins de dommages à la muqueuse en plus de réduire, *in vivo*, le niveau d'agrégation des plaquettes (Wallace et *al.*,

1994a; Wallace et *al.*, 1994b; Davies et *al.*, 1997). Ces dérivés exercent donc des effets protecteurs capables de contrecarrer les effets dommageables liés à l'inhibition des COX.

2.4.2 Dérivés d'anti-inflammatoires non-stéroïdiens liés au sulfure d'hydrogène

Les dérivés d'AINS liés au sulfure d'hydrogène (H₂S) ont été développés, plus récemment, par le même groupe de chercheurs auquel on attribue le développement des *NO-NSAIDs* (Wallace et *al.*, 2008). Le H₂S, tout comme le NO, est un médiateur gazeux important jouant un rôle clé dans la régulation de processus physiologiques et pathologiques (Li et *al.*, 2011). Plusieurs études ont montré que le H₂S pouvait contrebalancer la majorité des effets secondaires reliés à l'administration des AINS en atténuant certains éléments de l'inflammation (Wallace 2010). L'apport en H₂S interviendrait de deux façons, soit par des actions anti-inflammatoires, telles que l'inhibition de l'activation de la voie NF-κB par l'inhibition de la dégradation d'IκB-α empêchant ainsi la translocation de NF-κB au noyau (Li et *al.*, 2007), et par des effets protecteurs sur le tube digestif, comme l'inhibition de l'adhérence des leucocytes et la réduction de l'expression de cytokines pro-inflammatoires, telles que TNFα, IL-1β et IFNγ, résultant de l'inhibition de l'activation de NF-κB (Fiorucci et *al.*, 2005; Fiorucci et *al.*, 2007).

En comparaison avec leurs homologues classiques, les dérivés d'AINS liés au H₂S sont associés à un nombre significativement moins important de dommages gastro-intestinaux tout en inhibant aussi efficacement la synthèse de prostaglandines (Wallace et *al.*, 2007; Li et *al.*, 2007). Dans le tube digestif, le mécanisme par lequel le H₂S protégerait contre les entéropathies causées par les AINS semble inclure des changements dans au moins trois facteurs clés, soit la composition/sécrétion de la bile, le microbiote et la recirculation entérohépatique des AINS (Gemici et *al.*, 2015).

2.5 Le kétoprofène

Les travaux de cette étude portent sur le kétoprofène et un composé dérivé de cet AINS. Le kétoprofène, aussi connu sous l'appellation chimique acide 2-(3-benzoylphényl)-propionique, est un AINS classique de la classe des acides 2-arylpropionique (Figure 2). Le

kétoprofène est une molécule chirale dont seul l'énantiomère S possède des activités biologiques (Kokki, 2010). Ses propriétés anti-inflammatoires lui sont conférées par l'inhibition non spécifique des isoenzymes COX-1 et COX-2, telles que décrites précédemment. Le kétoprofène est principalement utilisé pour le soulagement symptomatique de la fièvre et le contrôle de la douleur à la fois chez l'enfant et chez l'adulte, en plus d'être utilisé comme traitement pour certaines conditions inflammatoires et musculo-squelettiques, telles que l'arthrite rhumatoïde et l'arthrose (Kokki, 2010; Glówka et *al.*, 2011).

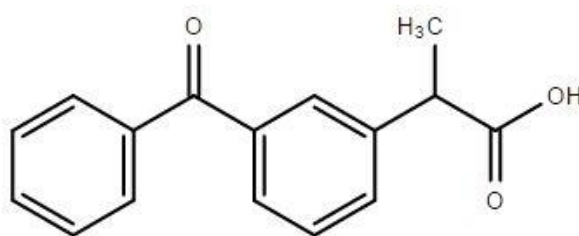


Figure 2 : Structure chimique du kétoprofène. Structure chimique de l'acide (S)-2-(3-benzoylphenyl)-propionique.

2.5.1 Dérivé du kétoprofène

Tout comme la grande majorité des AINS classiques, le kétoprofène possède un homologue lié à l' H_2S , connu sous l'appellation ATB-352. Ce dérivé est en fait une liaison de la structure classique du kétoprofène à un groupement 4-hydroxythiobenzamide (TBZ) ayant la capacité de relâcher le H_2S (Wallace et *al.*, 2008). Le mécanisme proposé de relâche du gaz et du kétoprofène à partir de l'ATB-352 est assez simple. Quelques minutes après son administration, l'hydrolyse du groupement thiol conduit à la libération du H_2S , résultant donc en un composé intermédiaire: le kétoprofène-4-hydroxybenzamide (Gemici et *al.*, 2015). Ce composé intermédiaire va ensuite se dissocier, quelques heures plus tard, libérant ainsi le kétoprofène et le groupement benzamide, tel que décrit à la figure 3.

À doses équimolaires, chez le rat, l'administration orale du kétoprofène seul résulte en des ulcérations au niveau de l'iléon, alors que les rats traités avec l'ATB-352 ne développent aucun dommage intestinal, bien que l'inhibition de la synthèse des prostaglandines et des

thromboxanes soit comparable entre le dérivé et son homologue classique (Gemici et *al.*, 2015). De plus, certains effets anti-cancer ont pu être associés à l'administration de l'ATB-352, alors que les souris APC^{Min/+} traitées avec le dérivé ont développé significativement moins de polypes que ceux traités au kétoprofène seul (Gemici et *al.*, 2015).

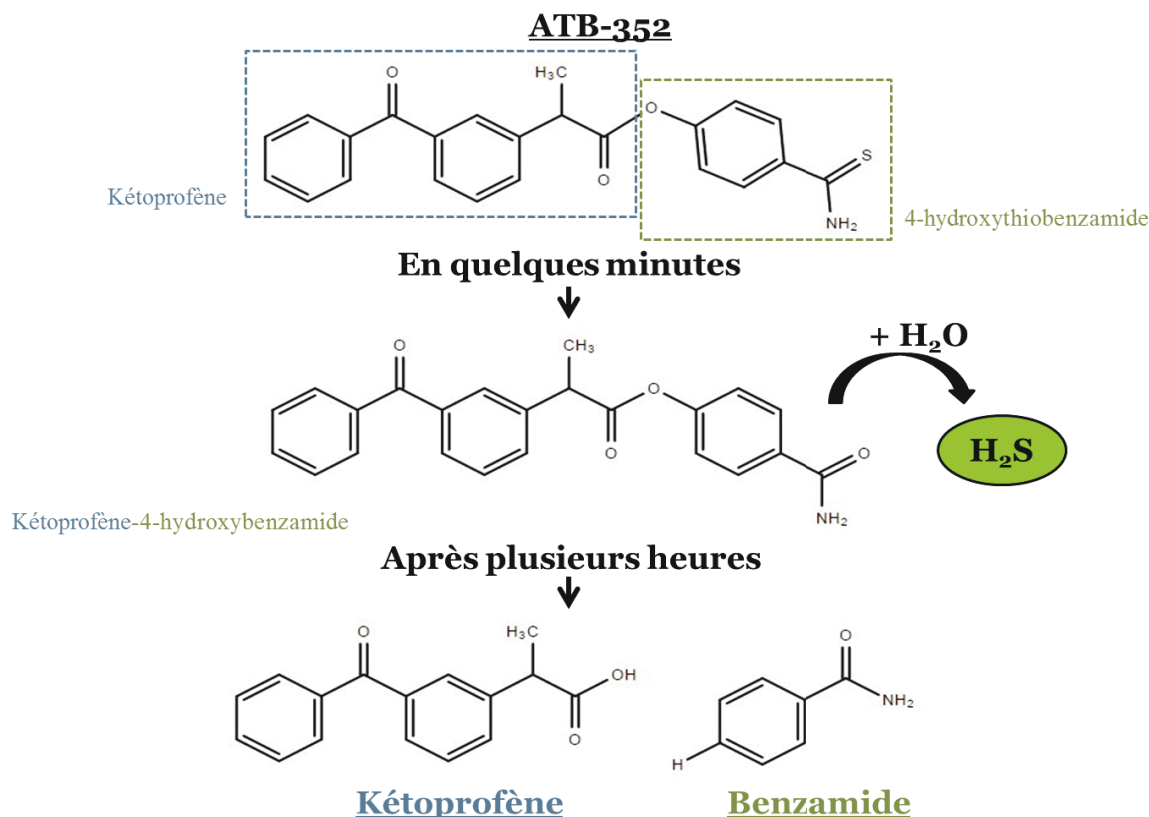


Figure 3 : Mécanisme proposé de la relâche du sulfure d'hydrogène (H₂S) et du kétoprofène à partir du dérivé ATB-352 suite à son administration orale. L'hydrolyse du groupement thiol conduit à la libération du H₂S quelques minutes après son administration. Quelques heures plus tard, une seconde dissociation permettra la libération du kétoprofène et du groupement benzamide. Adaptée de Gemici et *al.*, 2015.

3. Utilisation de la culture organotypique comme modèle expérimental

Le maintien *in vitro* d'explants intestinaux permet l'étude des fonctions de synthèse, des fonctions prolifératives ainsi que des fonctions sécrétoires de la muqueuse intestinale (Howdle, 1983). En 1985, Ménard et Arseneault (Ménard et Arseneault, 1985) ont mis en

place un protocole de culture organotypique d'explant d'intestin fœtal humain permettant leur maintien dans un environnement contrôlé pour plusieurs jours. En effet, en plus de conserver l'architecture morphologique de la muqueuse, la méthode de culture organotypique développée permet aussi de préserver la synthèse d'ADN et la synthèse protéique (Ménard et Arseneault, 1985).

Cette technique a permis d'étudier les effets de plusieurs composantes sur les processus biologiques de la muqueuse intestinale immature humaine, notamment l'influence de l'hydrocortisone (Ménard et *al.*, 1990) et les effets biologiques du facteur de croissance épidermique (EGF) (Ménard et *al.*, 1988). Plus récemment, cette méthode a aussi été utilisée pour déterminer les effets de certains anti-inflammatoires non-stéroïdiens, soit l'indométacine (Perron et *al.*, 2013) et l'ibuprofène (Ferretti et *al.*, en préparation), sur le profil d'expression génique de la muqueuse intestinale à mi-gestation, tel que discuté précédemment.

4. Hypothèse et objectifs

L'utilisation des AINS en périnatalogie est associée à plusieurs effets secondaires néfastes affectant une multitude d'organes, notamment le tube digestif, où elle contribue au développement d'entéropathies telles que la SIP et l'ENN. Ces effets secondaires ont d'ailleurs pu être observés sur la muqueuse intestinale immature humaine en culture organotypique en présence d'indométacine. Toutefois, dans le but de minimiser les effets secondaires indésirables amenés par l'administration d'AINS, des dérivés de ces drogues ont été développés en exploitant les effets cytoprotecteurs connus de gaz biologiquement actifs, comme le H₂S.

L'hypothèse de recherche soutenant cette étude est que l'administration de kétoprofène causerait des dommages à la muqueuse intestinale immature humaine similaire à ceux observés précédemment avec l'indométacine en contexte de culture organotypique. Toutefois, l'apport du H₂S par le dérivé ATB-352, permettrait l'atténuation de ces effets secondaires de par ses pouvoirs anti-inflammatoires et cytoprotecteurs. Deux objectifs ont été fixés dans le but de répondre à cette hypothèse. Dans un premier temps, une étude des

effets du kétoprofène dans la muqueuse intestinale immature humaine sera effectuée afin de déterminer si celui-ci affecte de la même manière les voies métaboliques significativement altérées en réponse à l'indométacine, précédemment caractérisées. L'expression des gènes impliqués dans ces voies métaboliques sera mesurée par RT-qPCR. L'objectif de ce premier volet est d'aider à la compréhension des mécanismes moléculaires responsables des entéropathies causées par les AINS. Dans un deuxième temps, une comparaison des effets du kétoprofène seul et de son dérivé, l'ATB-352, permettra l'évaluation de l'apport de H₂S sur les voies métaboliques précédemment caractérisées ainsi que sur les gènes des fonctions cibles de ce gaz.

Finalement, en plus de ces deux objectifs, comme plusieurs études ont mis en lumière la nécessité d'une normalisation des résultats de RT-qPCR adaptée pour chaque analyse plutôt que l'utilisation de gènes de référence communs «prévalidés», une sélection de gènes de référence appropriés sera d'abord effectuée à l'aide de diverses méthodes de calculs, logiciels et algorithmes afin de permettre une validation adéquate des résultats de RT-qPCR subséquents de l'expression de gènes de tissus provenant de cultures organotypiques d'intestin fœtal humain traitées aux AINS.

II- MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Origine des tissus utilisés

Pour évaluer les impacts du kétoprofène et de l'ATB-352 sur la muqueuse intestinale immature humaine, un ensemble de 6 spécimens d'intestin grêle (iléon) prélevés de 6 fœtus issus d'interruptions de grossesse légales âgés entre 17 et 20 semaines d'âge gestationnel ont été utilisés. Ces études ont été approuvées par le comité d'éthique de la recherche en santé chez l'humain du CIUSSS de l'Estrie-CHUS.

2. Culture organotypique

2.1 Origine des produits utilisés

Le kétoprofène et son dérivé, ATB-352, ont été obtenus du Pr. John L. Wallace (University of Calgary, Calgary, AB) afin que ceux-ci puissent être testés sur les explants d'intestin fœtal humain en culture organotypique. Les composés ont été obtenus sous forme de poudre et ont été dissous dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) (Thermo Fisher Scientific, Canoga Park, CA) dans le but d'obtenir des solutions stock de 10 mM.

2.2 Doses utilisées

Le choix des doses à utiliser pour l'évaluation des impacts du kétoprofène et de son dérivé est basé sur une étude de Llanas et collaborateurs (Llanas et *al.*, 1996) qui ont mesuré les concentrations plasmatiques retrouvées chez le nouveau-né suite à un traitement de kétoprofène reçu par la mère comme agent tocolytique. Les concentrations plasmatiques minimale et maximale retrouvées étaient de 0.5 et 3.0 mg/L (Llanas et *al.*, 1996), ce qui représente des concentrations de kétoprofène d'environ 2 et 12 μ M. Deux concentrations de kétoprofène ont donc été utilisées pour notre étude, soit 1 et 10 μ M. De plus, l'évaluation des effets de l'ATB-352 a été effectuée à doses équimolaires, donc les mêmes concentrations molaires ont été utilisés.

2.3 Culture

Les tissus d'intestins fœtaux ont été cultivés en accord avec la méthode de culture organotypique développée par Ménard et Arsenault (1985). Brièvement, chaque iléon prélevé a été sectionné en plusieurs explants de 5 mm². Pour chaque tissu, dix pétris de culture contenant entre 6 et 9 explants chacun ont été préparés, en raison de deux pétris par condition expérimentale, soit contrôle, traité au kétoprofène (University of Calgary) 1 µM et 10 µM et traité à l'ATB-352 (University of Calgary) 1 µM et 10 µM. Les explants ont été placés dans un pétri pour la culture d'organe (Falcon Plastics, Los Angeles, CA) contenant du milieu de culture Leibovitz L-15 (Thermo Fisher Scientific) sans sérum pour 48 heures et les milieux ont été changés aux 24 heures (Figure 4). Les explants ont été incubés à 37 °C dans une atmosphère contrôlée composée de 95 % d'air et 5 % de CO₂.

Pour l'étude précédente sur l'impact de l'indométacine (Perron et *al.*, 2013), utilisée ici comme comparatif et réévaluée en fonction des nouveaux gènes de référence, un ensemble de 4 spécimens d'intestin grêle (iléon) provenant d'interruptions de grossesse légales dont les fœtus étaient âgés entre 17 et 19 semaines ont été utilisés et cultivés de la même manière (contrôle et traité à l'indométacine 1 µM).

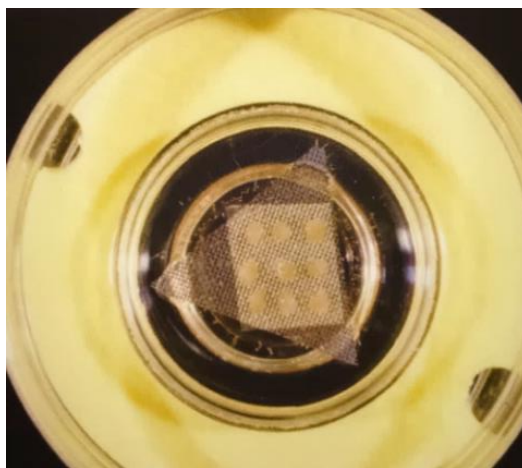


Figure 4 : Explants intestinaux immatures humains. Les explants sont déposés sur un papier lentille (avec la muqueuse vers le haut) qui est placé sur une grille d'acier inoxydable au milieu du pétri de culture. Le milieu de culture se retrouve sous la grille en volume suffisant pour que seul le bas du tissu soit immergé.

3. Extraction d'ARN, traitement DNase et transcription inverse

Les ARN ont été extraits avec le *TRIzol* (Thermo Fisher Scientific) selon le protocole du fabricant, puis gardés à -80°C. Les échantillons d'ARN ont d'abord subi un traitement à la DNase (Thermo Fisher Scientific) selon le protocole du fabricant, puis la transcription inverse des échantillons a été effectuée avec le *Superscript II* (Thermo Fisher Scientific).

4. qPCR

Toutes les réactions de qPCR ont été effectuées à l'aide du système *Real-time qPCR Mx3000p* (Stratagene, Cedar Creek, TX) et du *Brilliant II SYBR®Green QPCR Master Mix* (Stratagene), en duplicata. L'analyse de qPCR débute par 5 min d'activation de la Taq à 95 °C, suivi par 40 cycles de dénaturation (95 °C, 30 sec), hybridation (55 °C, 45 sec) et élongation (72 °C, 45 sec), puis se termine par une analyse de courbes de dissociation permettant de valider la spécificité des produits de PCR. Les données de fluorescence ont été acquises après chaque étape d'hybridation et sont exprimées en *cycle threshold* (Ct), soit le nombre de cycles auquel la fluorescence rapportée est plus grande que le seuil établi. Les amorces utilisées pour cette étude ont été conçues à l'aide du logiciel de formation d'amorces Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3>). Les différents candidats pour la sélection des gènes de référence sont listés au Tableau 2, alors que la liste des gènes étudiés suite à l'administration du kétoprofène ou de son dérivé figure au Tableau 3.

5. Analyse des données

5.1 Sélection des gènes de référence appropriés

La stabilité de l'expression de dix gènes métaboliques de base, listés au Tableau 2, a été évaluée selon cinq méthodes différentes, soit (1) la méthode de comparaison des coefficients de variation exprimés en pourcentage, (2) un dérivé de l'algorithme GeNorm retrouvé dans le logiciel qbase+, (3) le logiciel NormFinder, (4) le logiciel BestKeeper et (5) l'outil-web RefFinder.

5.1.1 Coefficient de variation (%CV)

La comparaison des coefficients de variation consiste en la division de l'écart-type par la moyenne des valeurs brutes de Ct obtenues suite au RT-qPCR, le tout exprimé en pourcentage. Un coefficient de variation bas traduit une meilleure stabilité, ainsi le gène ayant le CV le plus bas sera considéré comme celui dont l'expression est la plus stable.

Tableau 2 : Caractéristiques et séquences des différents gènes de référence étudiés

Symbole du gène	Nom du gène; Fonction de la protéine encodée	No. d'accension	Séquences des amorces 5'-3'	Longueur amplicon	Efficacité (%)
<i>ACTB</i>	Actin β ; Protéine structurale du cytosquelette	NM_001101	S: GGACTTCGAGCAAGAGATGG AS: AGCACTGTGTTGGCGTACAG	234 pb	114.5%*
<i>B2M</i>	β -2-microglobulin; Chaîne β des molécules CMH classe I	NM_004048	S : GTGCTCGCGCTACTCCTC AS : GTCAACTCAATGTCCGGAT	150 bp	96.8%
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Enzyme glycolytique	NM_002046	S: TCTCCTCTGACTTCAACAGCGAC AS: CCCTGTTGCTGTAGCCAAATTC	125 pb	95.7%
<i>HPRT1</i>	Hypoxanthine phosphoribosyl- transferase; Métabolisme de la purine	NM_000194	S : TGACACTGGCAAAACAATGCA AS : GGTCTTTTCACCAGCAAGCT	93 pb	100.8%
<i>MAN1B1</i>	Mannosidase alpha class 1B member 1; Biosynthèse du N-glycan	NM_016219	S: ACCGTGGAGAGCCTGTTCTA AS: GTTTGGGTCATCGGAGAAGA	234 pb	103.9%
<i>MTR</i>	5-methyltetrahydrofolate- homocysteine methyltransferase; Biosynthèse de la méthionine	NM_000254	S: TGTGGAGACTCGCAGACATC AS: CCTCAACCTGATCCTTGGA	153 pb	96.5%
<i>PGK1</i>	Phosphoglycerate kinase I; Enzyme glycolytique	NM_000291	S: CTGTGGGGGTATTTGAATGG AS: CTCCAGGAGCTCCAACTG	198 pb	100.7%
<i>PPIA</i>	Peptidylprolyl isomerase A; Repliement des protéines	NM_021130	S: GGCAAATGCTGGACCCAACACA AS: TGCTGGTCTTGCCATTCCTGGA	161 pb	99.2%
<i>RPS23</i>	Ribosomal protein S23; Composante de la sous-unité 40S	NM_001025	S: AGGAAGTGTGTAAGGGTCCAGC AS: CACCAACAGCATGACCTTTGCG	142 pb	96.1%
<i>RPS3A</i>	Ribosomal protein S3A; Composante de la sous-unité 40S	NM_001006	S: CCGGAAGAAGATGATGGAAA AS: CAACTTGGGCTTCTTCAGC	179 pb	97.6%

S, Sens; AS, Anti-sens.

* n=3, utilisée comme telle malgré que cette valeur dépasse les limites acceptées de 95-105%.

Tableau 3: Liste des amorces utilisées dans cette étude

Symbole du gène	Amorce sens	Amorce anti-sens	No. d'accension
<i>ATP5G1</i>	5'-ACAGCAACTTCCCACTCCAG-3'	5'-GCCAAGAATGGCATAGGAGA-3'	NM_005624
<i>CLDN-1</i>	5'-CCGTTGGCATGAAGTGATG-3'	5'-CCAGTGAAGAGAGCCTGACC-3'	NM_021101
<i>COX-2</i>	5'-ATCACAGGCTTCCATTGACC-3'	5'-CAGGATCACGCTCCACAGCA-3'	NM_000963
<i>CXCL14</i>	5'-AAGCTGGAAATGAAGCCAAA-3'	5'-GGCGTTGTACCACTTGATGA-3'	NM_004887
<i>CYP3A4</i>	5'-CAAGACCCCTTTFTFFAAAA-3'	5'-CGAGGCGACTTTCTTTCATC-3'	NM_017460
<i>DUOX2</i>	5'-CGGCAATCATCTATGGAGGT-3'	5'-ATGTGCAGGCTGAGTGTGTC-3'	NM_014080
<i>ICAM-1</i>	5'-CTTGAGGGCACCTACCTCTG-3'	5'-CATTATGACTGCGGCTGCTA-3'	NM_000201
<i>NDUFA9</i>	5'-CCGGAAGCCATTATCGTAAA-3'	5'-TTCACCAGGTGGAAGGAG-3'	NM_005002
<i>NOS2</i>	5'-CTCTATGTTTGCAGGGATGT-3'	5'-TTCTTCGCCTCGTAAGGAAA-3'	NM_000625
<i>OCN</i>	5'-TCCAATGGCAAAGTGAATGA-3'	5'-GCAGGTGCTCTTTTGAAGG-3'	NM_002538
<i>SOD2</i>	5'-GGAAGCCATCAAACGTGACT-3'	5'-CTGATTTGGACAAAGCAGCA-3'	NM_001024465
<i>TFF1</i>	5'-CACCATGGAGAACAAGGTGA-3'	5'-TGACACCAGGAAAACCACAA-3'	NM_003225

5.1.2 GeNorm

Basé sur Microsoft Excel, GeNorm (version 2.4; Biogazelle BE, Ghent, Belgique) évalue l'indice de stabilité des gènes par la variation moyenne par paire (*mean pairwise variation*) de l'expression d'un gène en le comparant avec tous les autres candidats testés. Ainsi, la valeur de stabilité, nommée *M value*, est définie comme l'écart-type des fonctions logarithmiques des valeurs de l'expression (Ct) des gènes comparés (Vandesompele et al., 2002). Donc, plus la *M value* est basse, plus l'expression du gène est considérée comme stable.

De plus, GeNorm se démarque en possédant la capacité de déterminer le nombre idéal de gènes de référence à utiliser. En effet, le calcul de la *V value* permet de déterminer l'influence de l'ajout d'un gène de référence au nombre de gènes précédent en utilisant le *normalization factor* (NF), soit la moyenne géométrique des valeurs de Ct obtenus pour les différents gènes dans chaque échantillon (Vandesompele et al., 2002). Ainsi, l'écart-type entre un NF_n pour n nombre de gènes de référence et un NF_{n+1} contenant les mêmes gènes de référence que l'ensemble précédent plus le gène suivant dans le classement de stabilité, permet d'évaluer l'impact sur la qualité de normalisation (Vandesompele et al., 2002). En effet, une valeur inférieure à la valeur seuil de 0.15 indique la nécessité de l'ajout de ce gène comme référence alors qu'une valeur supérieure à ce seuil témoigne d'une souffrance de la qualité de normalisation suite à l'ajout de ce gène (Vandesompele et al., 2002).

Conformément à l'utilisation du logiciel, les valeurs de Ct obtenues suite au RT-qPCR ont été transformées en forme linéarisée corrigée selon l'efficacité : méthode ΔCt , soit $Q=(E)^{\Delta Ct}$, où E représente l'efficacité de l'amplification des amorces et ΔCt la soustraction entre la valeur de Ct la plus basse et le Ct cible.

5.1.3 NormFinder

NormFinder a été développé, quelques années après son prédécesseur, dans le but de raffiner la méthode de sélection de gènes de référence. Tout comme GeNorm, NormFinder est un logiciel basé sur Microsoft Excel (complément Excel, version 0.953, disponible au <http://moma.dk/normfinder-software>), mais celui-ci repose sur un modèle mathématique plus complexe, permettant non seulement l'estimation de la variation globale des gènes (variation intergroupe), mais aussi la variation entre les sous-groupes d'échantillons (variation intragroupe) (Anderson et *al.*, 2004). Ainsi, la valeur de stabilité consiste en une combinaison des deux variations calculées, prenant en compte l'expression de chaque gène dans le groupe, la quantité d'ARN de chaque échantillon et la variation aléatoire causée par les facteurs biologiques et expérimentaux (Anderson et *al.*, 2004; Kozera et Rapacz, 2013). Cette stratégie permet donc d'évaluer l'erreur systématique introduite lors de l'utilisation d'un gène comme référence. Encore une fois, plus la valeur de stabilité est basse, plus l'expression du gène est considérée stable.

Conformément à l'utilisation du logiciel, les valeurs de Ct obtenues suite au RT-qPCR ont été transformées en valeurs de Ct corrigées selon l'efficacité : E^{-Ct} , où E représente l'efficacité de l'amplification des amorces.

5.1.4 BestKeeper

BestKeeper, développé en 2004 par Pfaffl et ses collaborateurs, est aussi un logiciel basé dans Microsoft Excel (complément Excel, disponible au <http://gene-quantification.org/bestkeeper.html>) utilisant une corrélation par paires similaire à GeNorm. Le logiciel génère d'abord le *BestKeeper index*, soit la moyenne géométrique des valeurs de Ct de tous les gènes étudiés groupés ensemble, puis calcule, entre autres, l'écart-type et

le coefficient de variation entre chaque candidat potentiel et ce *BestKeeper index* (Pfaffl et al., 2004). Les gènes sont classés en fonction de l'écart-type calculé, où la valeur la moins élevée représente l'expression la plus stable.

Conformément à l'utilisation du logiciel, les valeurs de Ct brutes obtenues suite au RT-qPCR ont été utilisées comme données d'entrée (*input data*).

5.1.5 RefFinder

Contrairement aux logiciels basés sur Microsoft Excel décrits précédemment, RefFinder, développé en 2012 par Xie et ses collaborateurs, est un outil de calculs disponible sur le web (<http://fulxie.0fees.us/?i=1>). En fait, cet outil intègre les algorithmes des différents logiciels mentionnés ci-haut en plus d'ajouter la méthode comparative des ΔCt (Silver et al., 2006) pour comparer et classer les différents candidats. Ainsi, RefFinder assigne un score aux différents gènes selon le classement obtenu pour chaque méthode, puis calcule la moyenne géométrique des différents scores attribués pour déterminer le classement final (Xie et al., 2012). Toujours selon la même logique, plus la moyenne des scores attribués est basse, plus l'expression du gène est considérée stable.

Conformément à l'utilisation de cet outil-*web*, ce sont les valeurs de Ct brutes obtenues suite au RT-qPCR qui ont été utilisées comme données d'entrée.

5.1.6 Classement cumulatif

Une valeur de stabilité ou un pourcentage de coefficient de variation faible traduit une plus grande stabilité de l'expression du gène. Ainsi, chaque gène est classé du plus stable au moins stable pour chacune des méthodes utilisées, suite à quoi un classement cumulatif a été effectué grâce à l'addition des différents classements obtenus permettant la sélection des gènes ayant l'expression la plus stable indépendamment du logiciel utilisé.

5.2 Expression des gènes

L'expression différentielle de gènes a été évaluée en comparant l'expression des explants contrôles (non traités) aux explants traités (kétoprofène ou ATB-352) en utilisant l'équation $R = (E_{\text{cible}})^{\Delta C_{\text{t cible}}} / (E_{\text{référence}})^{\Delta C_{\text{t référence}}}$, où E représente l'efficacité de l'amplification des amorces et ΔC_{t} la soustraction entre le C_{t} du contrôle non-traité et le C_{t} de l'échantillon traité (Pfaffl, 2001). La comparaison des effets de l'ATB-352 et du kétoprofène seul a pu être effectuée à l'aide d'un ratio ATB/Kétoprofène afin d'évaluer l'effet «ajouté» du H_2S sur la muqueuse intestinale immature humaine. Les analyses statistiques ont été effectuées par le logiciel GraphPad Prism 7 (GraphPad, San Diego, CA). Le *Wilcoxon test* a été utilisé pour évaluer la significativité de l'expression d'un gène par rapport à son expression contrôle (fixée à 1), alors que le *Mann-Whitney test* a été utilisé pour comparer l'expression d'un gène entre les différents traitements. Un *p value* inférieur à 0.05 a été considéré significatif.

III- RÉSULTATS

1. Sélection de gènes de référence adéquats

1.1 Profil d'expression des candidats investigués pour gènes de référence

L'expression de dix gènes métaboliques de base (*ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *HPRT1*, *MAN1B1*, *MTR*, *PGK1*, *PPIA*, *RPS23* et *RPS3A*; Tableau 1) a été évaluée dans les explants contrôles et les explants traités, soit au kétoprofène ou à l'ATB-352 à 1 et 10 μ M, afin de déterminer les gènes de référence les plus appropriés pour les études d'expression de gènes d'explants d'intestin fœtal humain en culture organotypique en présence d'AINS. Les 10 candidats couvrent une grande plage d'expression avec des valeurs de Ct (n=28) variant entre 16.18 et 40.84 (Figure 5A). *GAPDH*, *PPIA*, *RPS23* et *RPS3A* sont les gènes dont l'expression est la plus abondante dans les échantillons étudiés avec des valeurs de Ct médiane de 18.88, 18.42, 18.32 et 18.28, respectivement. En contraste, *B2M* est le gène le plus faiblement exprimé dans ces échantillons avec une valeur de Ct médiane de 29.98. Le patron d'expression des candidats en fonction des différents traitements a aussi été déterminé, permettant d'apprécier la variation d'expression de chaque gène amenée par les diverses conditions expérimentales (Figure 5B). Ces conditions ne semblent pas affecter de manière importante l'expression des gènes *HPRT1*, *MAN1B1*, *MTR*, *PPIA*, *RPS23* et *RPS3A* alors qu'elles semblent avoir beaucoup plus d'impact sur l'expression des gènes *ACTB*, *B2M* et *PGK1*.

1.2 Coefficient de variation (%CV)

Une manière simple et efficace d'évaluer la stabilité de l'expression des gènes de référence candidats est d'évaluer la variation des valeurs de Ct pour chaque gène. Les calculs de l'écart-type et de la moyenne de ces valeurs de Ct obtenus pour chaque gène ont donc permis de déterminer les coefficients de variation (CV) de ceux-ci (Tableau 4). Ainsi, la méthode des coefficients de variation a identifié *RPS23* comme gène ayant l'expression la

plus stable, alors que *B2M* a été identifié comme celui dont l'expression est la plus variable avec des CV de 3.16% et 10.14%, respectivement.

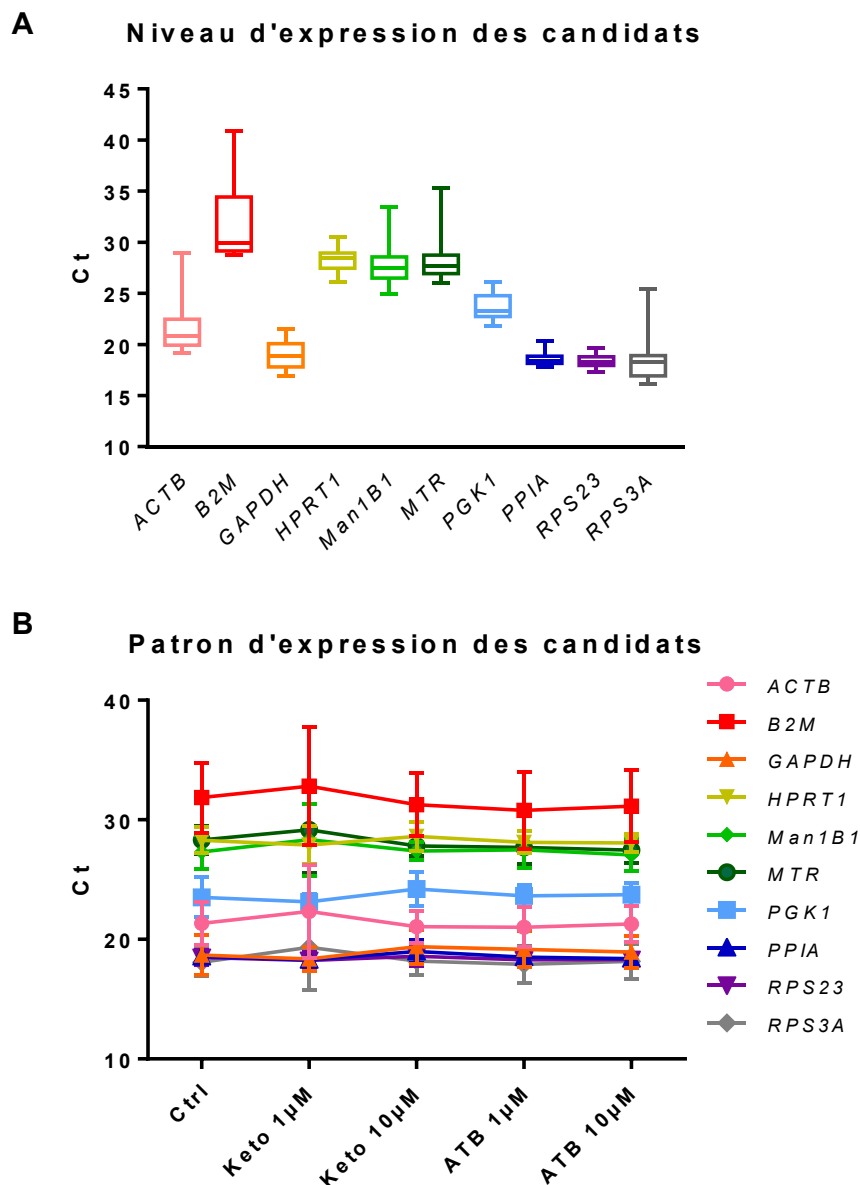


Figure 5. Profil d'expression des 10 candidats investigués comme gènes de référence. (A) Niveau d'expression des gènes candidats. La moyenne des valeurs de Ct obtenues pour chaque gène est montrée à l'aide d'une boîte à moustaches. La boîte indique le 25^{ème} et 75^{ème} percentile, la ligne à l'intérieur de la boîte représente la médiane et les moustaches montrent les maximum et minimum des valeurs de Ct obtenues. (B) Patron d'expression des candidats en fonction des différents traitements. Chaque point représente la moyenne \pm l'écart-type des valeurs de Ct obtenues pour chaque traitement.

Tableau 4: Valeurs obtenues par la méthode de comparaison des coefficients de variation

	<i>ACTB</i>	<i>B2M</i>	<i>GAPDH</i>	<i>HPRT1</i>	<i>MAN1B1</i>	<i>MTR</i>	<i>PGK1</i>	<i>PPIA</i>	<i>RPS23</i>	<i>RPS3A</i>
ÉT	2.06	3.20	1.36	1.08	1.65	1.77	1.18	0.64	0.58	1.83
Moy.	21.38	31.56	18.92	28.20	27.49	28.07	23.67	18.56	18.39	18.32
%CV	9.62	10.14	7.20	3.84	6.01	6.31	4.99	3.43	3.16	9.98

ÉT, écart-type; Moy, moyenne; %CV, coefficient de variation exprimé en pourcentage.

1.3 Analyse GeNorm

Dans le but de faciliter la sélection du gène de référence adéquat, plusieurs logiciels ont aussi été utilisés pour évaluer la stabilité de l'expression de chaque gène candidat. Comme il n'y a pas de consensus clair sur le logiciel à utiliser, quatre des plus populaires ont été investigués dans cette étude, soit GeNorm, NormFinder, BestKeeper et RefFinder.

Le premier algorithme employé, GeNorm, utilise la variation moyenne par paire d'un gène spécifique en comparaison avec les autres gènes pour évaluer la stabilité de l'expression de chaque gène, référée ici comme *M value*. Ainsi, l'analyse des valeurs de stabilité *M* calculées montre que *RPS23* est le gène candidat ayant l'expression la plus stable (*M value* de 0.088) alors que *GAPDH* est celui dont l'expression est la plus variable (*M value* de 0.143) (Figure 6A). De plus, l'analyse des valeurs *V* a permis de déterminer le nombre de gènes de référence optimal à utiliser (Figure 6B). Ces valeurs permettent de déterminer l'influence de l'ajout d'un gène de référence au nombre de gènes précédent avec une valeur seuil de 0.15, en haut de quoi l'inclusion d'un gène de référence additionnel est considérée comme ayant un impact négatif sur la qualité de normalisation. Ainsi, les valeurs *V* calculées ont révélé que la combinaison de deux gènes de référence est suffisante pour l'obtention d'une normalisation adéquate ($V_{2/3} = 0.12 < 0.15$). Par conséquent, le logiciel GeNorm a identifié les gènes *RPS23* et *PPIA*, soit le gène détenant le second rang en fonction de la stabilité de son expression (*M value* de 0.091), comme gènes de référence les plus adéquats pour la normalisation des résultats de RT-qPCR obtenus.

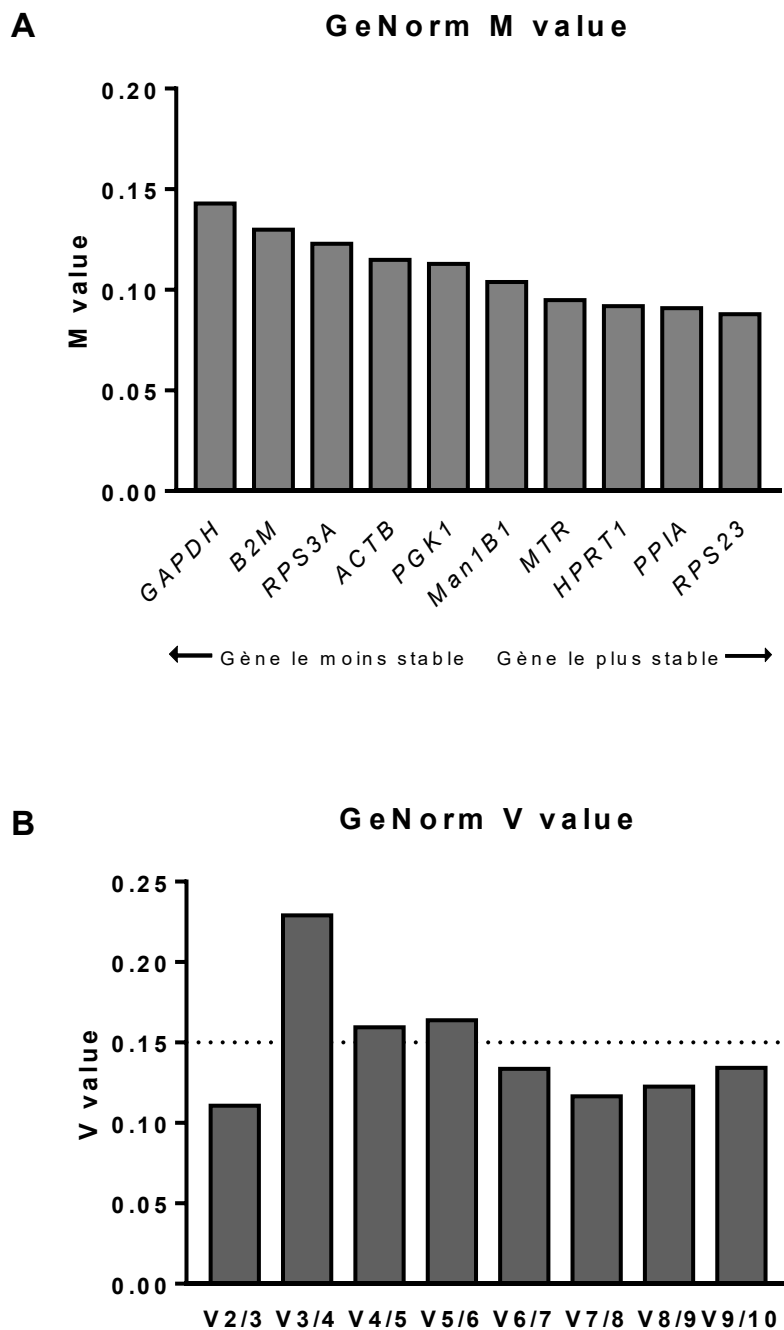


Figure 6. Stabilité de l'expression des gènes de référence candidats évaluée par le logiciel GeNorm. (A) Valeurs de stabilité M des 10 gènes de référence candidats. Moyennes des valeurs de stabilité M pour chaque gène, disposées du moins stable (gauche) au plus stable (droite). (B) Nombre optimal de gènes de référence requis pour une normalisation efficace. Les valeurs V représentent la variation par paires (V_n/V_{n+1}) calculée entre les facteurs de normalisation NF_n et NF_{n+1} . La ligne pointillée représente la valeur V seuil de 0.15.

1.4 Analyse NormFinder

Le second algorithme employé, NormFinder, utilise les variations inter- et intra-groupes combinées en valeur de stabilité pour comparer l'expression des différents candidats (Figure 7A). L'analyse des valeurs de stabilité obtenues par le logiciel montre que le gène ayant l'expression la plus stable est *RPS23* (0.212) alors que *B2M* est le gène dont l'expression est la plus variable (0.818). NormFinder a aussi calculé une valeur de stabilité pour la meilleure combinaison de deux gènes, soit *RPS23* et *MTR* (0.162). Les variations inter- et intra-groupes calculées par le logiciel sont montrées à la Figure 7B. Les colonnes représentent les variations intergroupes alors que les barres d'erreurs représentent la moyenne des variations intragroupes. Ainsi, les gènes ayant à la fois une variation intergroupes se rapprochant le plus près de zéro et une barre d'erreur la plus petite possible figurent parmi les gènes ayant la plus grande stabilité d'expression. Par conséquent, le logiciel NormFinder a identifié les gènes *RPS23* et *MTR* comme gènes de référence les plus adéquats pour la normalisation des résultats de RT-qPCR obtenus.

1.5 Analyse BestKeeper

Le troisième algorithme employé, BestKeeper, analyse trois résultats principaux, soit le coefficient de variation (CV), l'écart-type (ÉT) et le coefficient de corrélation (r) entre le *BestKeeper index* calculé et les valeurs de Ct obtenus pour établir la stabilité de l'expression de chaque gène (Tableau 5). Toutefois, c'est la valeur de l'écart-type (ÉT [\pm Ct]) qui est utilisée pour le classement de la stabilité. Ainsi, l'analyse par le logiciel BestKeeper montre que *PPIA* est le gène ayant l'expression la plus stable alors que *B2M* est celui dont l'expression est la plus variable avec des écarts-types de 0.46 et 2.68, respectivement. Par conséquent, le logiciel BestKeeper a identifié le gène *PPIA* comme gène de référence le plus adéquat pour la normalisation des résultats de RT-qPCR obtenus.

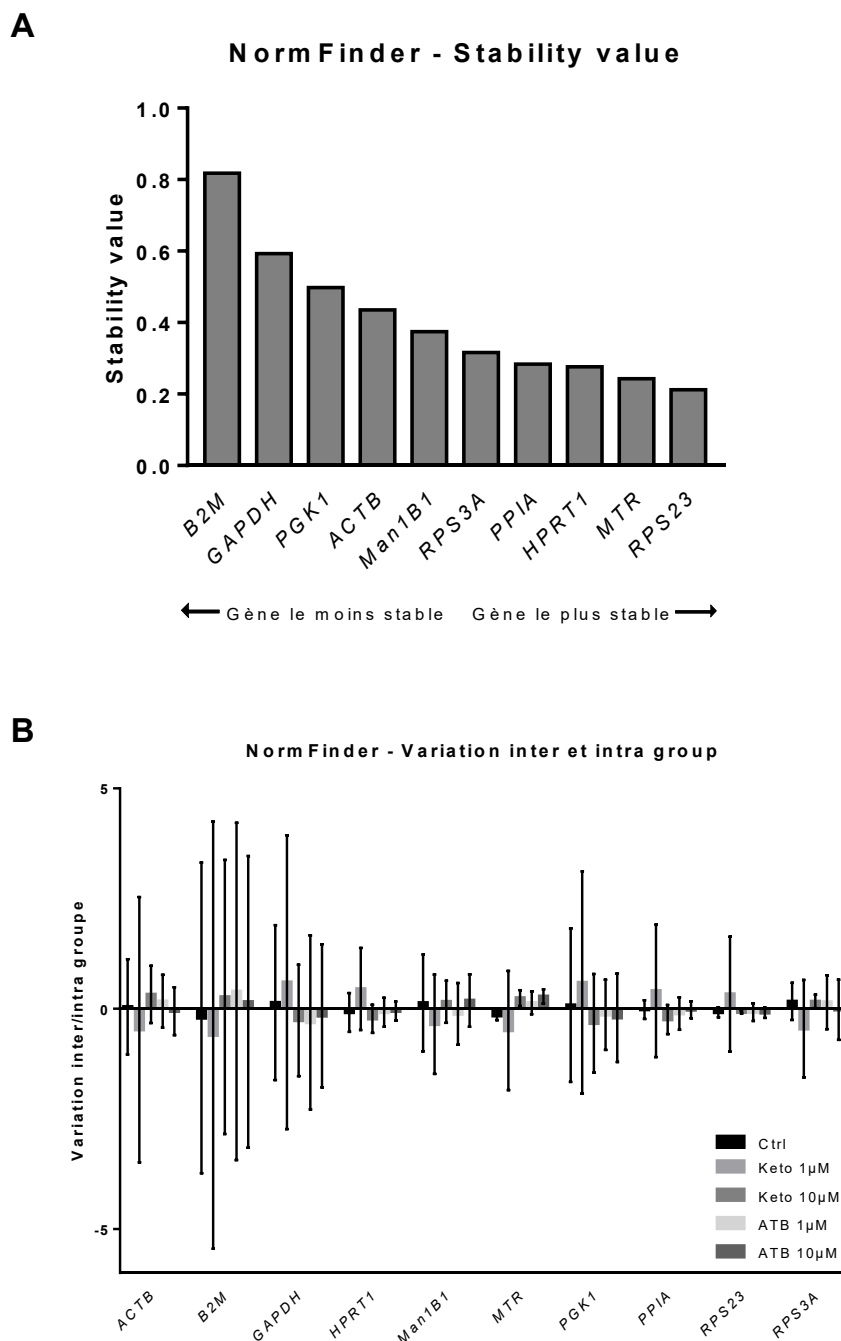


Figure 7. Stabilité de l'expression des gènes de référence candidats évaluée par le logiciel NormFinder. (A) Valeurs de stabilité des 10 gènes de référence candidats. Moyennes des valeurs de stabilité calculées pour chaque gène, disposées du moins stable (gauche) au plus stable (droite). (B) Variations inter- et intra-groupes estimés par l'algorithme NormFinder. Les colonnes représentent les variations intergroupes et les barres d'erreurs indiquent l'intervalle de confiance des variations intergroupes pour chaque gène candidat selon les moyennes des variations intragroupes.

Tableau 5: Données brutes de l'analyse par le logiciel BestKeeper

	<i>ACTB</i>	<i>B2M</i>	<i>GAPDH</i>	<i>HPRT1</i>	<i>MAN1B1</i>	<i>MTR</i>	<i>PGK1</i>	<i>PPIA</i>	<i>RPS23</i>	<i>RPS3A</i>
n	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28
moy. géo [Ct]	21.30	31.41	18.87	28.18	27.45	28.02	23.64	18.55	18.38	18.24
moy. ar [Ct]	21.38	31.56	18.92	28.20	27.49	28.07	23.67	18.56	18.39	18.32
min [Ct]	19.21	28.76	16.90	26.09	24.93	26.05	21.78	17.77	17.34	16.18
max [Ct]	28.98	40.84	21.54	30.52	33.40	35.34	26.08	20.30	19.63	25.44
ÉT [±Ct]	1.47	2.68	1.17	0.86	1.18	1.13	0.99	0.46	0.47	1.26
CV [%Ct]	6.89	8.50	6.20	3.07	4.31	4.04	4.17	2.48	2.56	6.86
min [x-fold]	-4.25	-6.03	-3.76	-4.27	-6.01	-3.78	-3.65	-1.71	-2.01	-4.57
max [x-fold]	205.56	590.73	6.00	5.02	69.54	140.62	5.47	3.34	2.33	199.91
ÉT [± x-fold]	2.78	6.43	2.26	1.82	2.27	2.19	1.98	1.38	1.39	2.39
coeff. corr. [r]	0.895	0.768	-0.091	0.617	0.699	0.861	0.072	0.404	0.602	0.846
p-value	0.001	0.001	0.642	0.001	0.001	0.001	0.714	0.033	0.001	0.001

Moy, moyenne; géo, géométrique; Ct, *cycle threshold*; ar, arithmétique; min, minimum; max, maximum; ÉT, écart-type; CV, coefficient de variation; coeff corr, coefficient de corrélation.

1.6 Analyse RefFinder

Finalement, l'outil-*web* RefFinder utilise les algorithmes des logiciels GeNorm, NormFinder et BestKeeper ainsi que la méthode comparative des ΔCt pour attribuer un score de stabilité aux différents gènes selon chaque méthode. Le calcul de la moyenne des différents scores attribués permet le classement des gènes selon leur stabilité par RefFinder (Figure 8). Ainsi, *RPS23* a été classé comme gène ayant l'expression la plus stable alors que *B2M* a été classé comme celui ayant l'expression la plus variable avec des moyennes de scores de 1.189 et 10.000, respectivement. Par conséquent, l'outil-*web* RefFinder a

identifié le gène *RPS23* comme gène de référence le plus adéquat pour la normalisation des résultats de RT-qPCR obtenus.

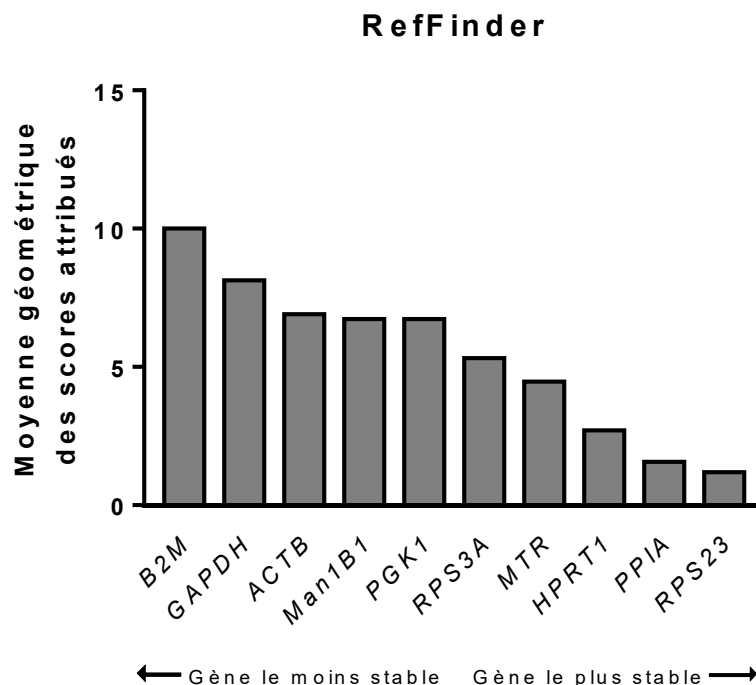


Figure 8. Stabilité de l'expression des gènes de référence candidats évaluée par l'outil-web RefFinder. Moyennes géométriques des scores attribués pour chaque gène, disposées du moins stable (gauche) au plus stable (droite).

1.7 Sommaire des analyses

Un classement des gènes en accord avec les résultats obtenus pour chacune des 5 méthodes a pu être établi (Tableau 6). L'addition des différents classements obtenus à l'aide de ces méthodes a été effectuée pour chacun des candidats afin d'identifier le gène ayant l'expression la plus stable indépendamment du logiciel utilisé. Ainsi, le classement cumulatif a déterminé *RPS23* comme étant le gène ayant l'expression la plus stable alors que *B2M* se retrouve tout au bas du tableau, avec des classements cumulatifs de 6 et 49, respectivement. Toutefois, selon les résultats de *V value* obtenus par le logiciel GeNorm, deux gènes de référence doivent être utilisés afin d'obtenir une normalisation adéquate (Figure 6B). Par conséquent, ce classement cumulatif permet donc d'établir que *RPS23* et *PPIA*, soit le gène détenant le second rang en fonction de la stabilité de son expression avec

un classement cumulatif de 11, représentent la combinaison de gènes de référence idéale pour cette étude d'expression de gènes d'explants d'intestin fœtal humain traités aux AINS (Tableau 6).

Tableau 6 : Classement cumulatif des 10 gènes de référence candidats

Classement	%CV	GeNorm (<i>M value</i>)	NormFinder (<i>Stability value</i>)	BestKeeper (Écart-type)	RefFinder (Moy. des scores)	Sommaire
1	<i>RPS23</i> 3.16	<i>RPS23</i> 0.088	<i>RPS23</i> 0.212	<i>PPIA</i> 0.46	<i>RPS23</i> 1.189	<i>RPS23</i> 6
2	<i>PPIA</i> 3.43	<i>PPIA</i> 0.091	<i>MTR</i> 0.243	<i>RPS23</i> 0.47	<i>PPIA</i> 1.565	<i>PPIA</i> 11
3	<i>HPRT1</i> 3.84	<i>HPRT1</i> 0.092	<i>HPRT1</i> 0.276	<i>HPRT1</i> 0.86	<i>HPRT1</i> 2.711	<i>HPRT1</i> 15
4	<i>PGK1</i> 4.99	<i>MTR</i> 0.095	<i>PPIA</i> 0.284	<i>PGK1</i> 0.99	<i>MTR</i> 4.472	<i>MTR</i> 21
5	<i>MAN1B1</i> 6.01	<i>MAN1B1</i> 0.104	<i>RPS3A</i> 0.316	<i>MTR</i> 1.13	<i>RPS3A</i> 5.318	<i>PGK1</i> 28
6	<i>MTR</i> 6.31	<i>PGK1</i> 0.113	<i>MAN1B1</i> 0.375	<i>GAPDH</i> 1.17	<i>PGK1</i> 6.727	<i>MAN1B1</i> 30
7	<i>GAPDH</i> 7.20	<i>ACTB</i> 0.115	<i>ACTB</i> 0.435	<i>MAN1B1</i> 1.18	<i>MAN1B1</i> 6.735	<i>RPS3A</i> 35
8	<i>ACTB</i> 9.62	<i>RPS3A</i> 0.123	<i>PGK1</i> 0.498	<i>RPS3A</i> 1.26	<i>ACTB</i> 6.901	<i>ACTB</i> 39
9	<i>RPS3A</i> 9.98	<i>B2M</i> 0.130	<i>GAPDH</i> 0.593	<i>ACTB</i> 1.47	<i>GAPDH</i> 8.132	<i>GAPDH</i> 41
10	<i>B2M</i> 10.14	<i>GAPDH</i> 0.143	<i>B2M</i> 0.818	<i>B2M</i> 2.68	<i>B2M</i> 10.000	<i>B2M</i> 49
Paire la plus stable	-	<i>RPS23/PPIA</i>	<i>RPS23/MTR</i>	-	-	<i>RPS23/PPIA</i>

CV, coefficient de variation; Moy, moyenne.

2. Évaluation des effets directs du kétoprofène sur l'expression génique de la muqueuse intestinale immature humaine comparativement à ceux précédemment observés avec l'indométacine

L'évaluation des effets directs du kétoprofène sur la muqueuse intestinale immature humaine a été possible grâce à la culture organotypique, utilisée ici comme modèle expérimental. L'analyse par RT-qPCR des explants traités et non-traités a permis de déterminer l'impact du kétoprofène sur certaines voies métaboliques importantes précédemment identifiées comme étant significativement altérées en réponse à l'indométacine comme montrées à la figure 3 de Perron et *al.*, 2013 (Annexe II). Afin que la comparaison entre les deux AINS soit plus facile, l'expression des gènes impliqués dans ces différentes voies métaboliques en réponse à l'indométacine a été réévaluée à l'aide des nouveaux gènes de référence établis, soit *RPS23* et *PPIA*. Ainsi, les impacts du kétoprofène et de l'indométacine ont donc été évalués sur l'activité oxydoréductase (*CYP3A4*, *DUOX2*,

NOS2, *SOD2*), la phosphorylation oxydative (*ATP5G1* et *NDUFA9*), la réponse inflammatoire (*CXCL14* et *TFF1*) ainsi que sur la perméabilité intestinale (*OCN* et *CLDN-1*).

Tel que montrée précédemment, l'expression des oxydoréductases *DUOX2* et *NOS2* est diminuée en réponse à l'indométacine alors que l'expression de *CYP3A4* est augmentée (Figure 9A, gauche). De plus, l'indométacine affecte aussi l'expression de gènes impliqués dans la phosphorylation oxydative et la réponse inflammatoire, particulièrement les gènes *NDUFA9* (Figure 9B, gauche) et *TFF1* (Figure 9C, gauche) dont les expressions sont diminuées en réponse au traitement à l'indométacine et sur *CXCL14* dont l'expression est augmentée (Figure 9C, gauche). Finalement, une légère surexpression des gènes *OCN* et *CLDN-1*, impliqués dans la perméabilité intestinale, est aussi observée suite au traitement à l'indométacine (Figure 9D, gauche).

Du côté des explants traités au kétoprofène, deux concentrations ont été utilisées, soit 1 et 10µM. Toutefois, on observe que les deux concentrations semblent avoir le même effet sur l'expression des gènes étudiés, puisqu'aucune différence significative n'a été observée entre elles (Figure 9, gauche). L'expression de *CYP3A4* ainsi que des différentes oxydoréductases, soit *DUOX2*, *NOS2* et *SOD2*, semble être augmentée en réponse au kétoprofène, bien que seule la hausse de *CYP3A4* (KT 10 µM) soit significative (Figure 9A, droite). Pour ce qui est de la phosphorylation oxydative, l'expression de l'*ATP5G1* est légèrement diminuée en réponse au kétoprofène 10µM alors que celle du *NDUFA9* ne semble pas être affectée (Figure 9B, droite). Le kétoprofène influence aussi la réponse inflammatoire en augmentant l'expression du *CXCL14*, toutefois celui-ci ne semble pas avoir d'effet sur l'expression du gène *TFF1* (Figure 9C, droite). Finalement, les gènes impliqués dans la perméabilité intestinale semblent aussi être modulés en réponse au kétoprofène, soit une tendance à l'augmentation de l'expression de l'*OCN* et de la *CLDN-1*, bien que ces résultats ne soient pas significatifs (Figure 9D, droite).

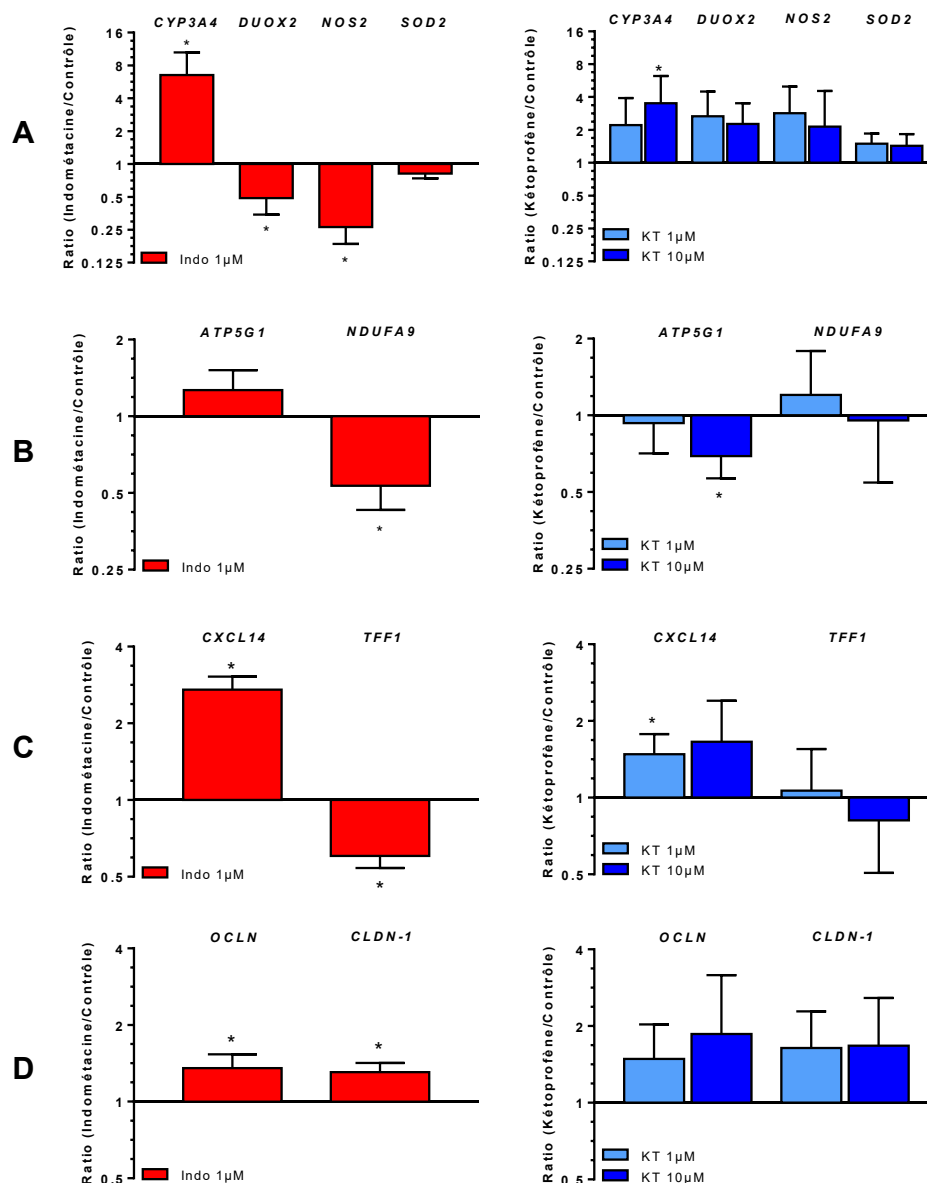


Figure 9. Comparaison des effets différentiels de l'indométacine et du kétoprofène sur les marqueurs de l'activité oxydoréductase, la phosphorylation oxydative, la réponse inflammatoire et la perméabilité intestinale de la muqueuse intestinale immature humaine. Analyse par RT-qPCR de l'expression des gènes de A) l'activité oxydoréductase (*CYP3A4*, *DUOX2*, *NOS2* et *SOD2*), B) de la phosphorylation oxydative (*ATP5G1* et *NDUFA9*), C) de la réponse inflammatoire (*CXCL14* et *TFF1*) et D) de la perméabilité intestinale (*OCLN* et *CLDN-1*) des muqueuses intestinales immatures humaines (iléons) mises en culture organotypique en présence d'indométacine 1 μM (Gauche) et de kétoprofène 1 et 10 μM (Droite) après 48 heures. Les résultats sont exprimés en ratio d'explants traités (Indo ou KT) sur explants non-traités (Ctrl), sur une échelle logarithmique en base 2 (Log2). Les valeurs montrées sont les moyennes de 4 (Indo) et 6 (KT) cultures biologiques indépendantes. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types. * $p < 0.05$ en fonction du segment contrôle non-traité.

2.1 Deux modèles de réponse

En regardant les moyennes obtenues pour les différents gènes en réponse au kétoprofène, soit des augmentations de plus de deux fois qui ne sont pas significatives ainsi que des barres d'erreurs très imposantes, deux tendances semblent être présentes au sein des échantillons d'explants traités au niveau des résultats individuels. Dans le but de confirmer, mais surtout d'expliquer ces tendances, l'expression du messenger de *COX-2* a été analysée dans les 6 différentes cultures traitées au kétoprofène et à l'ATB-352 afin d'observer leur réponse aux traitements (Figure 10). En effet, parmi les 6 cultures analysées, deux modèles de réponse semblent être présents, soit 3 cultures où l'expression du messenger de *COX-2* est augmentée en réponse aux traitements et 3 cultures où celle-ci ne semble pas être affectée. Dès lors, ces cultures ont été divisées en 2 groupes selon leur réponse au traitement, soit un groupe de «répondeurs» où l'expression du messenger de *COX-2* est augmentée et un groupe de «non-répondeurs» où cette expression semble invariable. La distinction entre les deux groupes de réponse a été gardée pour le reste de l'étude.

L'impact du kétoprofène sur les gènes étudiés a été ré-analysé en gardant cette distinction afin d'apprécier ses effets dans les deux différents groupes de réponse (Figure 11). Comme aucune différence n'a été observée entre les deux doses de kétoprofène, celles-ci ont été groupées ensemble pour les résultats suivants. Alors que l'expression du *CYP3A4* est augmentée dans les 2 groupes, celles des oxydoréductases varient grandement entre ceux-ci (Figure 11A). *DUOX2*, *NOS2* et *SOD2* sont modulées à la hausse chez le groupe de répondeurs alors que leur expression est pratiquement invariable chez les non-répondeurs (Figure 11A). Le kétoprofène ne semble pas avoir d'impact négatif sur les gènes impliqués dans la phosphorylation oxydative et la réponse inflammatoire chez les répondeurs, alors que chez les non-répondeurs, celui-ci diminue l'expression des gènes impliqués dans la phosphorylation oxydative en plus d'augmenter l'expression de la chimiokine *CXCL14* (Figure 11B et C). Finalement, l'expression des gènes impliqués dans la perméabilité intestinale est aussi différente d'un groupe à l'autre. En effet, alors que l'expression de l'*OCLN* et de la *CLDN-1* ne semble pas être modulée dans le groupe des non-répondeurs, celle-ci est augmentée de plus de 2 fois chez celui des répondeurs (Figure 11D). Par

conséquent, cette nouvelle distinction de réponse permet de mieux apprécier l'impact du kétoprofène sur les différentes voies métaboliques mentionnées plus haut.

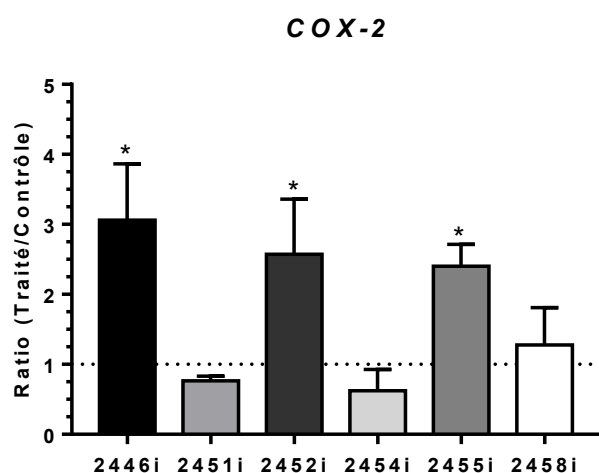


Figure 10. Évaluation de la réponse au traitement des différentes cultures selon l'expression du messenger de *COX-2*. Expression du messenger de *COX-2* des différentes cultures par RT-qPCR. Les valeurs montrées représentent les moyennes d'expression pour l'ensemble des conditions expérimentales pour chacune des cultures. Les résultats sont exprimés en ratio d'explants traités sur explants non-traités (Ctrl). Les barres d'erreurs représentent les écarts-types. La ligne pointillée représente un ratio de 1, à savoir une absence de variation de l'expression en fonction du segment contrôle. * $p < 0.05$ en fonction du segment contrôle non-traité.

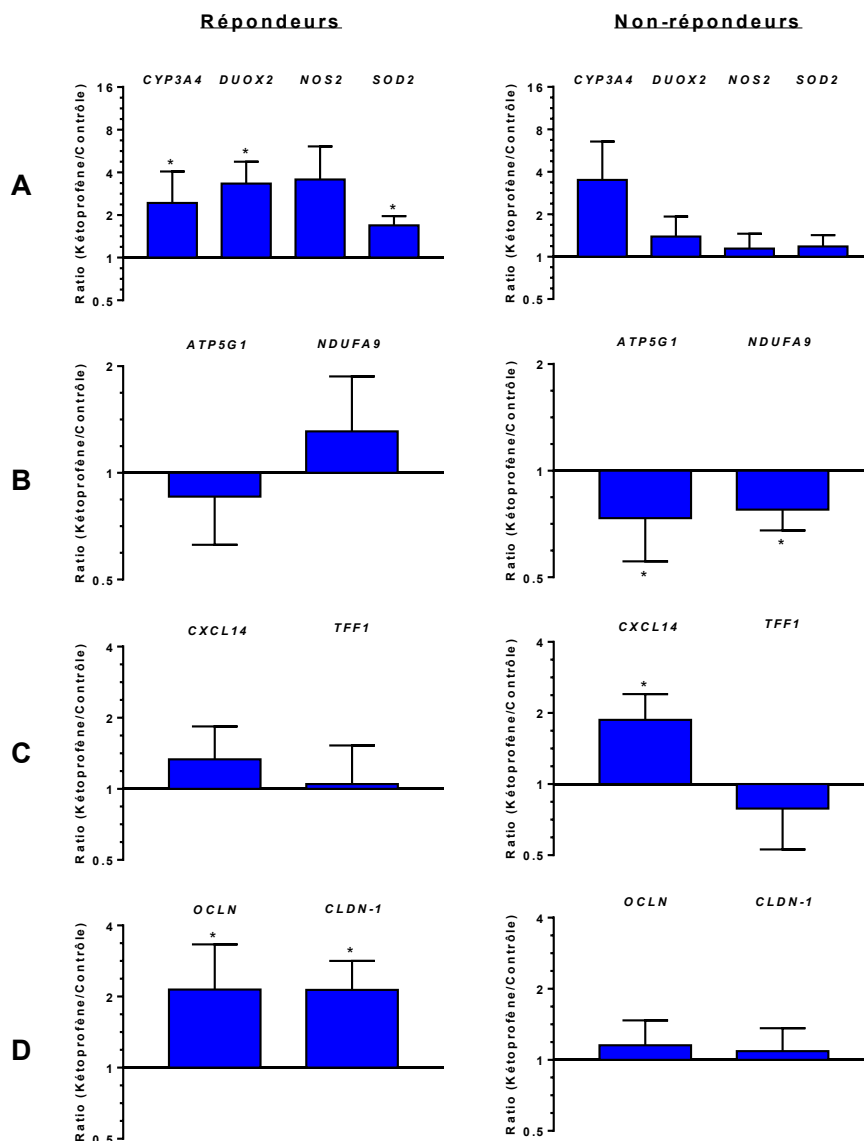


Figure 11. Comparaison des effets différentiels des deux groupes de réponse du kétoprofène sur les marqueurs de l'activité oxydoréductase, la phosphorylation oxydative, la réponse inflammatoire et la perméabilité intestinale de la muqueuse intestinale immature humaine. Analyse par RT-qPCR de l'expression des gènes de A) l'activité oxydoréductase (*CYP3A4*, *DUOX2*, *NOS2* et *SOD2*), B) de la phosphorylation oxydative (*ATP5G1* et *NDUFA9*), C) de la réponse inflammatoire (*CXCL14* et *TFF1*) et D) de la perméabilité intestinale (*OCLN* et *CLDN-1*) des explants de muqueuses intestinales immatures humaines (iléons) «répondeurs» (gauche) et «non-répondeurs» (droite) mis en culture organotypique en présence de kétoprofène 1 et 10 μ M, après 48 heures. Les résultats sont exprimés en moyennes de ratio d'explants traités (KT 1 et 10 μ M) sur explants non-traités (Ctrl), sur une échelle logarithmique en base 2 (Log2). Les valeurs montrées sont les moyennes de 6 cultures biologiques indépendantes, à savoir 3 cultures «répondeurs» et 3 cultures «non-répondeurs». Les barres d'erreurs représentent les écarts-types. * $p < 0.05$ en fonction du segment contrôle non-traité.

3. Impact de l'apport de l'H₂S par le dérivé ATB-352 sur l'expression génique de la muqueuse intestinale immature humaine

L'évaluation des effets de l'H₂S sur la muqueuse intestinale immature humaine a été effectuée via le traitement des explants en culture organotypique à l'ATB-352, un dérivé de kétoprofène permettant le relâchement du sulfure d'hydrogène une fois administré. Une analyse par RT-qPCR a d'abord permis de déterminer les impacts de l'apport de H₂S sur les voies métaboliques précédemment analysées avec le kétoprofène seul (Figure 12). Cette comparaison a pu être effectuée à l'aide d'un ratio ATB/Kétoprofène afin d'évaluer l'effet «ajouté» du H₂S sur la muqueuse intestinale immature humaine. Hormis pour l'expression du *CXCL14* dans le groupe des répondeurs (Figure 12C, gauche) où l'apport en H₂S semble posséder un impact statistiquement significatif, quoique non physiologiquement significatif, le gaz ne semble pas affecté l'expression des différents gènes impliqués dans les fonctions étudiées comparativement au kétoprofène seul (Figure 12).

Dans le but d'étudier l'impact du H₂S sur la muqueuse intestinale immature humaine, une seconde analyse a pu être effectuée en fonction des propriétés attribuées au sulfure d'hydrogène. En effet, celui-ci est connu pour réduire l'adhésion des leucocytes ainsi que l'expression de certaines cytokines pro-inflammatoires causées par l'administration des AINS. Ainsi, l'impact du H₂S sur l'expression de la molécule d'adhésion *ICAM-1* et de la cytokine *TNFα* a été évalué (Figure 13). Les gènes codant pour ces protéines sont tous deux surexprimés en réponse au kétoprofène et à l'ATB-352 chez le groupe des répondeurs alors que seul *ICAM-1* est significativement augmenté en réponse au kétoprofène chez les non-répondeurs (Figure 13 A et B). Toutefois, aucune différence significative dans ces expressions n'est observable entre les explants traités au kétoprofène et ceux traités à l'ATB-352 (Figure 13 C et D).

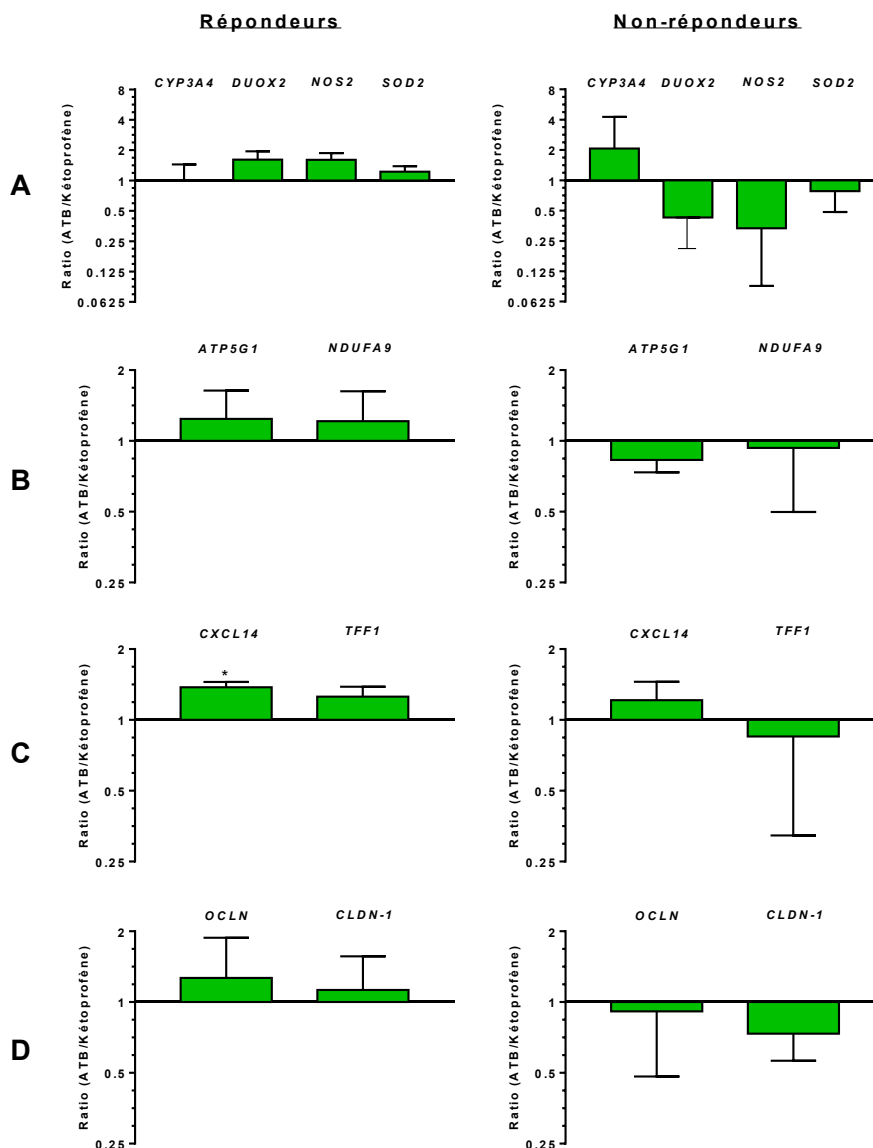


Figure 12. Évaluation de l'effet du H₂S sur les marqueurs de l'activité oxydoréductase, la phosphorylation oxydative, la réponse inflammatoire et la perméabilité intestinale de la muqueuse intestinale immature humaine en fonction des deux groupes de réponse établis. Analyse par RT-qPCR de l'expression des gènes de A) l'activité oxydoréductase (*CYP3A4*, *DUOX2*, *NOS2* et *SOD2*), B) de la phosphorylation oxydative (*ATP5G1* et *NDUFA9*), C) de la réponse inflammatoire (*CXCL14* et *TFF1*) et D) de la perméabilité intestinale (*OCLN* et *CLDN-1*) des explants de muqueuses intestinales immatures humaines (iléons) «répondeurs» (gauche) et «non-répondeurs» (droite) mis en culture organotypique en présence de kétoprofène et d'ATB-352 (1 et 10 µM), après 48 heures. Les résultats sont exprimés en moyennes de ratio d'explants traités à l'ATB-352 (1 et 10 µM) sur explants traités au kétoprofène (1 et 10 µM) sur une échelle logarithmique en base 2 (Log2). Les valeurs montrées sont les moyennes de 6 cultures biologiques indépendantes, à savoir 3 cultures «répondeurs» et 3 cultures «non-répondeurs». Les barres d'erreurs représentent les écarts-types. *p<0.05 en fonction des explants traités au kétoprofène.

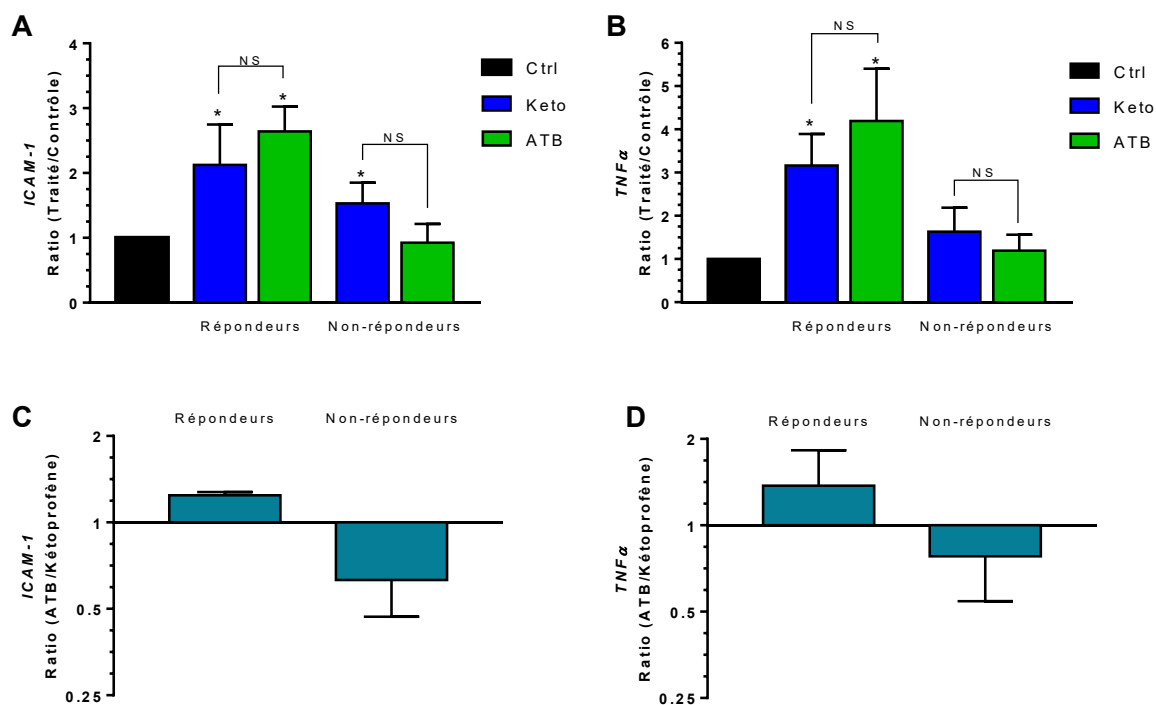


Figure 13. Évaluation des effets du H₂S sur les gènes impliqués dans ses fonctions cibles théoriques. Analyse par RT-qPCR de l'expression des gènes (A et C) *ICAM-1* et (B et D) *TNFα* des explants de muqueuses intestinales immatures humaines (iléons) «répondeurs» et «non-répondeurs» mis en culture organotypique en présence de kétoprofène et d'ATB-352 (1 et 10 μ M), après 48 heures. (A et B) Les résultats sont exprimés en moyenne de ratio des explants traités (KT et ATB 1 et 10 μ M) sur explants non-traités (Ctrl). (C et D) Les résultats sont exprimés en moyennes de ratio d'explants traités à l'ATB-352 (1 et 10 μ M) sur explants traités au kétoprofène (1 et 10 μ M) sur une échelle logarithmique en base 2 (Log2). Les valeurs montrées sont les moyennes de 6 cultures biologiques indépendantes, à savoir 3 cultures «répondeurs» et 3 cultures «non-répondeurs». Les barres d'erreurs représentent les écarts-types. * $p < 0.05$ en fonction du segment contrôle non-traité. NS, non-significatif.

IV- DISCUSSION

1. Sélection des gènes de référence appropriés pour la culture organotypique d'intestins fœtaux humains traités aux anti-inflammatoires non-stéroïdiens

L'utilisation d'un ou plusieurs gènes de référence adéquats est primordiale pour l'interprétation des résultats obtenus par RT-qPCR. En effet, il a été montré, à de nombreuses reprises, que le choix de gènes de référence influence grandement les conclusions des études basées sur le RT-qPCR (Caradec et *al.*, 2010). Ainsi, une analyse approfondie permettant la sélection des gènes de référence appropriés pour chaque nouveau projet doit être effectuée. Bien que quelques études se sont intéressées au choix de gènes de référence dans le tissu intestinal sous diverses conditions expérimentales (Dydenborg et *al.*, 2006; Krzystek-Korpacka et *al.*, 2014), aucune ne portait directement sur l'utilisation de ces gènes en contexte de culture organotypique en réponse à un traitement anti-inflammatoire.

Cette étude a donc fait appel à plusieurs méthodes de calculs différentes afin de permettre la sélection de gènes de référence appropriés pour l'étude d'expression de gènes dans des explants d'intestin fœtal humain en culture organotypique. Puisque la sélection de ces gènes de référence représente l'élément clé dans la validation et l'interprétation des résultats obtenus suite au RT-qPCR, et comme il n'existe aucun consensus clair quant à la méthode à utiliser, une combinaison de plusieurs approches spécialisées empruntant chacune des voies différentes pour évaluer la stabilité de l'expression de chaque gène semblait de mise. Cette analyse inclut donc les résultats obtenus de cinq méthodes, soit la comparaison des coefficients de variation, les compléments Excel GeNorm, NormFinder et BestKeeper et l'outil-*web* RefFinder, ayant toutes préalablement fait leurs preuves dans de nombreuses publications antérieures. Ces méthodes varient de la plus simple, soit la comparaison des coefficients de variation, à des algorithmes beaucoup plus complexes comme celui utilisé par le logiciel NormFinder.

Dix gènes métaboliques de base possédant des fonctions différentes ont été présélectionnés pour une analyse approfondie. Parmi ceux-ci figurent les gènes de référence les plus fréquemment utilisés dans le domaine du RT-qPCR, tels que *l'ACTB*, *B2M* et *GAPDH*, un des plus utilisés quant à la culture organotypique, *RPS3A*, et plusieurs autres ayant fait partie de nombreuses études antérieures sur les gènes de référence dans le tissu intestinal, entre autres, soit *HPRT1*, *MAN1B1*, *MTR*, *PGK1*, *PPIA* et *RPS23* (Dydensborg et *al.*, 2006; Krzystek-Korpacka et *al.*, 2014).

Cette étude a permis d'identifier *RPS23* comme étant le gène ayant l'expression la plus stable parmi les 10 candidats étudiés indépendamment de la méthode statistique utilisée. En effet, selon le classement cumulatif, alors que le gène *RPS23* domine le palmarès, le gène *B2M* se retrouve tout au bas du classement. Il est intéressant de noter que les gènes les plus fréquemment utilisés dans la normalisation «aveugle» des résultats de RT-qPCR occupent les derniers rangs du classement cumulatif établi, permettant ainsi de mettre l'accent sur l'importance d'une normalisation adaptée pour chaque analyse plutôt que l'utilisation de gènes de référence «prévalidés». Les analyses des résultats des différents logiciels ont permis de conclure, d'abord qu'une paire de gènes de référence était suffisante pour une validation adéquate des résultats obtenus, comme suggéré par le logiciel GeNorm, et enfin, que les gènes *RPS23* ainsi que *PPIA* représentaient la combinaison de gènes de référence idéale pour l'étude d'expression de gènes dans des explants d'intestin fœtal humain en culture organotypique traités aux AINS. Par conséquent, *PPIA* et *RPS23* ont été utilisés pour la suite des calculs quant à l'évaluation des effets du kétoprofène et de son dérivé sur la muqueuse intestinale immature humaine.

2. Évaluation des effets directs du kétoprofène et de son dérivé lié à l'H₂S sur la muqueuse intestinale immature humaine

Le kétoprofène est un anti-inflammatoire non-stéroïdien classique capable d'inhiber de façon non spécifique les isoenzymes COX-1 et COX-2 responsables du déclenchement de la cascade d'inflammation via la production de prostaglandines. Bien qu'utilisé principalement pour ses propriétés analgésiques et antipyrétiques chez l'adulte et l'enfant, le kétoprofène n'a jamais été mis en cause avec le développement de l'ENN. Dans la

littérature, outre les observations morphologiques quant au développement d'ulcères et d'érosions intestinales chez le rat, peu d'études s'intéressent aux effets du kétoprofène sur les différentes fonctions métaboliques de l'intestin. La toxicité attribuée au kétoprofène dépend de nombreux facteurs et celle-ci diffère d'une étude à l'autre. Les effets néfastes associés au kétoprofène semblent être spécifiques à chaque énantiomère (Cabré et al., 1998; de la Lastra et al., 2000), toutefois certaines études se contredisent. En effet, l'équipe de la Lastra et collaborateurs (2000) a montré que l'énantiomère S(+) n'affecte pas l'activité de la myéloperoxydase (MPO) et de la superoxyde dismutase (SOD) dans la muqueuse intestinale de rat, contrairement au kétoprofène racémique et à l'énantiomère R(-). L'équipe de Cheng et ses collaborateurs (2014), de son côté, a plutôt montré que l'énantiomère S(+) était la cause d'une baisse significative de l'activité des enzymes antioxydantes catalase, GRd, GSH, GPx, GST et SOD. L'évaluation de la gastrotoxicité des AINS sur les animaux de laboratoire, que ce soit chez la souris ou le rat, est biaisée par le fait que les dommages à la muqueuse sont généralement observés avec des doses d'AINS qui, sur la base du poids de l'animal, sont bien au-delà de celles utilisées chez l'humain. Les études sur les effets du kétoprofène ne font pas exception à ces observations. Les effets indésirables du kétoprofène sont fréquemment documentés lorsque celui-ci est administré à des doses supérieures à celles recommandées ou lors de traitements à long terme (Cheng et al., 2014; de la Lastra et al., 2000), mais rarement rapportés suite à une dose unique reflétant les concentrations utilisées chez l'humain (Holzer et al., 2001).

Cette étude a été entreprise dans le but d'évaluer les effets directs du kétoprofène sur la muqueuse intestinale immature humaine afin d'aider à la compréhension des mécanismes moléculaires responsables des entéropathies causées par les AINS. De plus, une comparaison de ses effets à ceux de l'indométacine, précédemment étudiés, a pu être effectuée en plus d'évaluer les effets bénéfiques d'un apport en H₂S par le dérivé ATB-352 comparativement au kétoprofène seul.

La culture organotypique a été utilisée comme modèle expérimental pour cette étude puisqu'elle permet l'analyse des effets du kétoprofène et de son dérivé sur un tissu intestinal humain complet, soit un intestin fœtal immature formé d'un épithélium, d'une *lamina propria*, d'une *muscularis mucosae*, d'une sous-muqueuse et d'une couche

musculaire, permettant de reproduire ce qui se passe au niveau de l'intestin d'un embryon, d'un fœtus ou d'un nouveau-né prématuré suite à l'administration d'AINS. À ce stade de développement, soit à mi-gestation, les cellules immunitaires, tels que les macrophages et les lymphocytes, font aussi partie intégrante du système (Maheshwari et *al.*, 2009). Bien que le recrutement de ces cellules dans la circulation sanguine ne puisse être effectué, l'activation locale de celles-ci peut avoir lieu suite à un stimulus. De plus, certaines composantes non-épithéliales sont aussi présentes dans le modèle utilisé et leur influence doit être prise en compte. Toutefois, les récentes publications du laboratoire ont mis en évidence l'épithélium comme étant le premier répondant aux différents stimuli (Ménard et *al.*, 2012; Perron et *al.*, 2013).

2.1 Impact du kétoprofène sur la muqueuse intestinale immature humaine

Les analyses par RT-qPCR ont permis d'établir l'impact du kétoprofène sur les voies métaboliques importantes précédemment identifiées comme étant significativement altérées en réponse à l'indométacine comme montrées à la figure 3 de Perron et *al.*, 2013 (Annexe II). La première analyse des données effectuée, en incluant toutes les cultures d'explants traités, montrait quelques tendances dans l'expression de certains gènes sans toutefois que celles-ci soient significatives, et ce, même pour des augmentations et/ou diminutions de l'expression de ces gènes de plus de 2 fois. C'est la réponse au traitement des explants, soit le niveau d'expression du gène *COX-2* qui a permis de faire une distinction importante entre les différentes cultures. La raison la plus simple pour expliquer la distinction entre répondeurs et non-répondeurs réside dans la logique derrière le concept de médecine personnalisée, soit que différents sujets puissent répondre de manière différente à un même traitement. Les AINS sont des inhibiteurs pharmacologiques de l'activité des isoenzymes COX, inhibant ainsi la production de prostaglandines. Toutefois, en absence de prostaglandines, le système reçoit un signal pour augmenter la production de COX, c'est pourquoi une augmentation de l'expression du messager de *COX-2* peut être observée dans les cultures identifiées subséquentement comme «répondeurs». La distinction entre les deux modèles de réponse obtenus a donc permis d'apprécier, de façon plus juste,

l'impact du kétoprofène sur les différentes voies métaboliques étudiées en regardant le groupe de répondeurs.

De manière intéressante, le kétoprofène semble avoir un impact important sur l'expression des gènes impliqués dans l'activité oxydoréductase, à savoir *CYP3A4*, *DUOX2*, *NOS2* et *SOD2*. *CYP3A4* représente la forme intestinale la plus abondante du cytochrome P450 qui est responsable du métabolisme d'un grand nombre de médicaments (Thummel, 2007). L'augmentation de son expression, suite au traitement avec le kétoprofène, permet donc de valider la fonctionnalité des tissus étudiés, bien que ceux-ci soit immatures. La dual oxydase 2 (*DUOX2*), augmentée en réponse au kétoprofène, est une oxydase NADPH chargée de la production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) relâché dans la lumière intestinale (Grasberger et al., 2013). Cette enzyme jouerait aussi, au niveau de l'intestin, un rôle dans la défense de l'hôte (Grasberger et al., 2013). Pour sa part, l'enzyme *NOS2* aussi connu sous le nom d'iNOS, qui est également surexprimée suite au traitement au kétoprofène, est une oxyde nitrique synthase induite en réponse à l'inflammation ou à un stimulus immunologique, responsable de l'augmentation de la synthèse des médiateurs pro-inflammatoires, tels que les interleukines 6 et 8 (Coleman, 2001). Tout comme *DUOX2*, *NOS2* serait aussi impliquée dans la défense immune (Coleman, 2001). Finalement, l'expression de la superoxyde dismutase 2 (*SOD2*), une enzyme antioxydante mitochondriale, est aussi modulée à la hausse en réponse au kétoprofène. Cette enzyme serait responsable de la protection contre le stress oxydatif de par sa capacité à «dismuter» les radicaux libres, c'est-à-dire de procéder à l'oxydation et à la réduction de ceux-ci (Fukai et Ushio-Fukai, 2011). Un autre fait intéressant est la surexpression des gènes *OCLN* et *CLDN-1*, impliqués dans la perméabilité intestinale, en réponse au kétoprofène. L'occludine et la claudine-1 sont des protéines structurales du complexe de jonctions serrées, jouant un rôle important dans le maintien et la fonction de la barrière intestinale (Musch et al., 2006; Gassler et al., 2001).

En somme, le traitement au kétoprofène provoque une surexpression des oxydoréductases étudiées impliquées dans le stress oxydatif, mais aussi dans la défense de l'hôte, ainsi qu'une possible diminution de la perméabilité intestinale de par la surexpression de gènes impliqués dans le complexe de jonctions serrées. L'interprétation de ces résultats se clarifie

en comparant les effets du kétoprofène obtenus à ceux précédemment étudiés avec l'indométacine.

2.2 Comparaison des effets du kétoprofène à ceux précédemment caractérisés de l'indométacine sur la muqueuse intestinale immature humaine

L'indométacine est l'AINS de référence pour le traitement de la persistance du canal artériel ainsi que comme agent tocolytique (Berkman et *al.*, 2003; Van Overmeire et Chemtob, 2005). Les récents travaux du laboratoire ont montré l'impact de l'indométacine sur la muqueuse intestinale immature en utilisant, également, la culture organotypique comme modèle expérimental. Les résultats de cette étude montrent que l'indométacine module plusieurs voies métaboliques importantes autres que celles attendues reliées à l'inflammation. En effet, celle-ci exerce un impact négatif considérable sur les gènes impliqués dans les processus de glycolyse, de phosphorylation oxydative et de l'activité oxydoréductase (Perron et *al.*, 2012). Ensemble, ces résultats ont permis d'établir un mécanisme probable par lequel l'indométacine exercerait ses effets secondaires néfastes sur la muqueuse intestinale, à savoir qu'un dérèglement du métabolisme du glucose et de la fonction mitochondriale causerait un épuisement d'ATP et une production accrue de ROS résultant en une perturbation de la fonction de la barrière intestinale (Perron et *al.*, 2012; Basivireddy et *al.*, 2002).

Une des différences majeures entre la réponse au kétoprofène et celle à l'indométacine réside en l'expression des oxydoréductases étudiées. Alors que l'expression de *DUOX2*, *NOS2* et *SOD2* est augmentée en réponse au kétoprofène, celle-ci est diminuée suite à un traitement à l'indométacine. Cette différence serait explicable par le mécanisme d'action différent des deux AINS.

L'indométacine exerce son pouvoir anti-inflammatoire par l'inhibition de la voie principale du métabolisme de l'acide arachidonique (AA), soit la production de prostaglandines, via l'inhibition de l'activité des isoenzymes COX (Pollard et Earnshaw, 2002). Par contre, l'inhibition de la synthèse des prostaglandines par l'indométacine provoquerait une augmentation de la dégradation de l'AA par la voie secondaire (Figure 14), via l'enzyme 5-

lipoxigénase qui est responsable de la production de leucotriènes, dont la leucotriène B4 (LTB4), un médiateur inflammatoire très important (Berganó et *al.*, 2014). En plus d'augmenter la perméabilité microvasculaire et promouvoir l'infiltration des neutrophiles, la LTB4 stimule aussi la production de ROS par le relâchement de superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) par les neutrophiles et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par les macrophages (Hedi et Norbert 2004; Berganó et *al.*, 2014). Par conséquent, cela suggère que la surproduction de ces dérivés réactifs de l'oxygène contribuerait au stress oxydatif et aux dommages causés à la muqueuse observables suite à l'administration d'indométacine traduit par une diminution des oxydoréductases étudiées.

Toutefois, contrairement à l'indométacine et aux autres AINS classiques, le kétoprofène serait un inhibiteur à double action capable d'inhiber à la fois la synthèse des prostaglandines et celle des leucotriènes (Figure 15) par l'inhibition de l'action des enzymes cyclooxygénases et des lipoxigénases (LOX) (Sinatra et *al.*, 2009).

La double inhibition des COX et des LOX par le kétoprofène préviendrait l'augmentation de la production des leucotriènes, et du même coup la production de ROS, ce qui pourrait expliquer la surexpression des oxydoréductases clés étudiées.

L'approche utilisée pour l'évaluation des impacts du kétoprofène est l'étude de marqueurs comme indicateurs d'altérations métaboliques et fonctionnelles. Une extrapolation de l'étude des composés sur l'expression des gènes impliqués dans les différentes fonctions métaboliques ciblées permet de déduire les différentes fonctions intestinales modifiées suite à l'administration d'AINS. Ainsi, en ayant un impact sur l'expression des gènes impliqués dans l'activité oxydoréductase, jouant aussi tous un rôle dans la défense de l'hôte, le kétoprofène et l'indométacine possèderaient un impact fonctionnel sur les mécanismes d'oxydoréduction et de défense intestinaux. Ces impacts fonctionnels pourraient éventuellement être validés dans un modèle animal de l'ENN, toutefois aucun modèle adéquat n'est disponible.

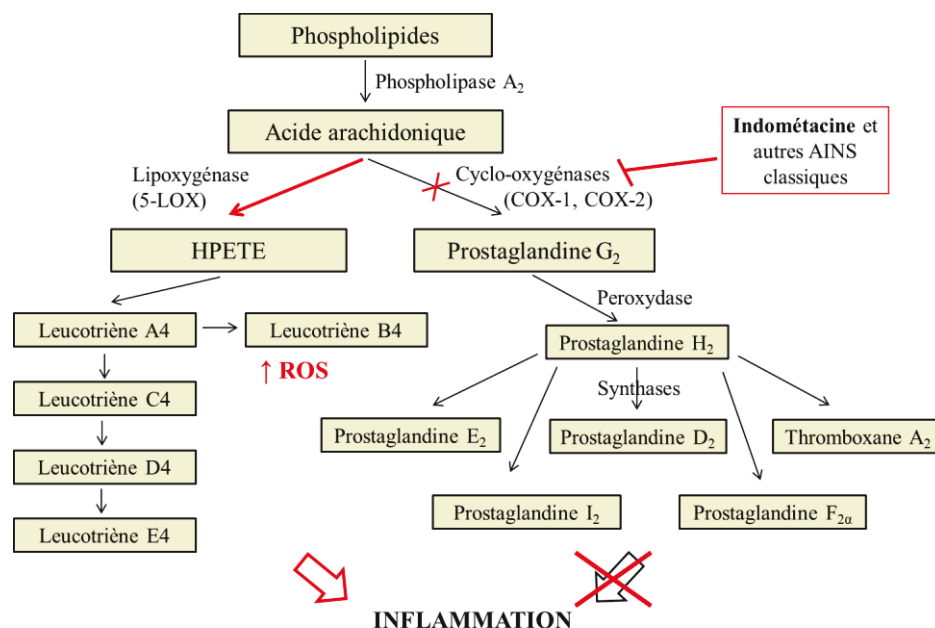


Figure 14 : Mécanisme d'action de l'indométacine et ses effets sur la synthèse des leucotriènes. L'inhibition de la synthèse des prostaglandines par l'indométacine provoquerait une augmentation de la dégradation de l'AA par la voie secondaire, via l'enzyme 5-lipoxygénase, augmentant ainsi la production de la leucotriène B4, entres autres, responsable de la production de ROS.

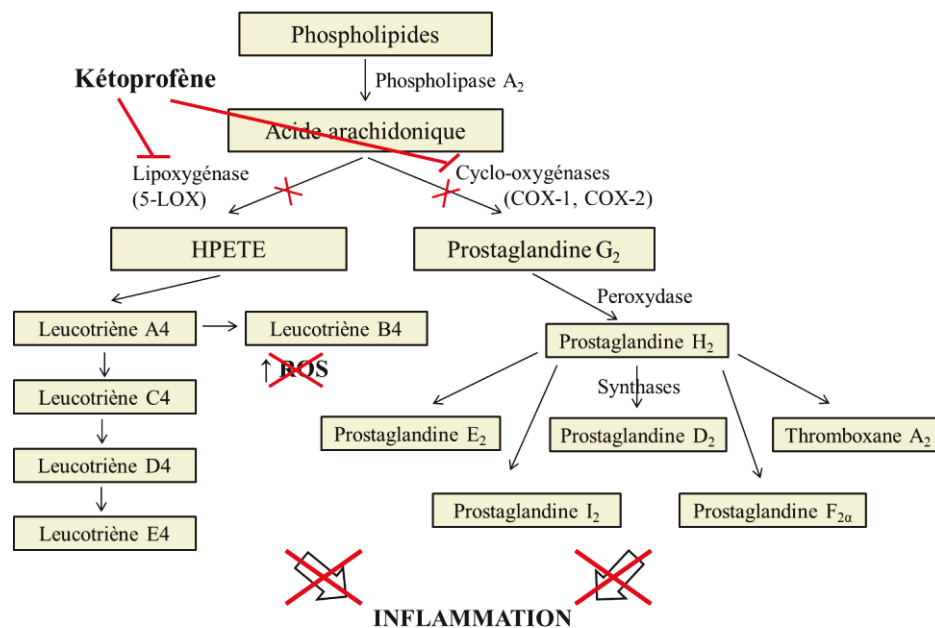


Figure 15 : Mécanisme d'action de la double inhibition de la synthèse des prostaglandines et des leucotriènes par le kétoprofène. La double inhibition des COX et des LOX par le kétoprofène préviendrait l'augmentation de la production des leucotriènes, et du même coup la production de ROS.

2.3 Impact local de l'apport d'H₂S par le dérivé ATB-352

Dans le but de minimiser les effets secondaires néfastes attribués à l'administration des AINS, des dérivés de ces médicaments liés au H₂S ont été développés afin d'exploiter les effets cytoprotecteurs et anti-inflammatoires attribués à ce gaz (Li et *al.*, 2011). Parmi ces dérivés se retrouve l'ATB-352, un dérivé de kétoprofène lié à un groupement 4-hydroxythiobenzamide qui permet le relâchement du H₂S une fois administré, développé par le professeur John L. Wallace (Gemici et *al.*, 2015). Dans le but de mesurer l'impact local de l'ATB-352 sur la muqueuse intestinale immature humaine, une comparaison des effets de l'ATB-352 et du kétoprofène seul, en culture organotypique, a pu être effectuée afin d'évaluer les effets «ajoutés» d'un apport en H₂S sur la muqueuse intestinale immature humaine.

Des études ont montré que l'administration d'un donneur d'H₂S préviendrait les dommages oxydatifs causés à la muqueuse en plus d'atténuer certains éléments de l'inflammation amenés par l'administration d'AINS (Wallace et *al.*, 2007; Li et *al.*, 2007; Fiorucci et *al.* 2007; Gemici et *al.*, 2015). En effet, le H₂S possède la capacité d'inhiber l'adhérence des leucocytes et leur migration aux sites d'inflammation en plus de réduire la production de certaines cytokines pro-inflammatoires (Fiorucci et *al.*, 2005). Toutefois, les analyses effectuées sur les gènes impliqués dans les fonctions métaboliques précédemment étudiées, soit l'activité oxydoréductase, la phosphorylation oxydative, la réponse inflammatoire et la perméabilité intestinale, en plus des gènes cibles du gaz, soit la molécule d'adhésion *ICAM-1* et la cytokine pro-inflammatoire *TNFα*, n'ont pas permis de démontrer l'efficacité du H₂S. Cependant, ces résultats peuvent être facilement explicables lorsqu'on s'attarde au relâchement du gaz à partir du dérivé ATB-352 (Figure 3). En fait, le mécanisme de relâche du H₂S à partir du dérivé n'est pas encore complètement élucidé. On sait que le dérivé est effectivement capable de relâcher le gaz (Wallace et *al.*, 2008), par contre le moment de la relâche est encore nébuleux, à savoir si elle est effectuée dès que le composé est administré ou si elle est effectuée seulement une fois que le composé est absorbé par la cellule (Caliendo et *al.*, 2010; Gu et Zhu 2011).

Dans la littérature, toutes les études réalisées sur les dérivés liés à l'H₂S ont été effectuées *in vivo* chez le rat, soit dans un système fermé. Par contre, aucune étude n'a étudié ou

mesuré la réaction du composé *in vitro*, dans un système ouvert. Dès lors, ceci amène un questionnement quant au moment de la relâche du gaz. Si cette relâche est effectuée trop rapidement, soit lors de l'ajout dans le milieu, le gaz n'aura pas le temps d'agir sur la muqueuse intestinale et sera ainsi épuisé avant même d'avoir eu un quelconque impact. Par conséquent, ceci pourrait expliquer l'absence d'effets du composé ATB-352 sur le profil d'expression des gènes étudiés dans cette étude.

Par contre, bien qu'aucune efficacité n'ait été démontré pour le H₂S, cette étude a permis de voir, de façon indirecte, que le benzamide, issu de la dissociation du dérivé qui est libéré en même temps que le kétoprofène, ne semble pas avoir d'effets, toxiques ou non, sur la muqueuse intestinale immature humaine.

V- CONCLUSION

En conclusion, cette étude a permis de démontrer que localement le kétoprofène semble engendrer une réponse moins néfaste que l'indométacine, possiblement dû à son rôle de double inhibiteur des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'acide arachidonique. Cette conclusion met de l'avant l'importance de la compréhension des mécanismes moléculaires responsables des entéropathies causées par les AINS. Toutefois, il serait intéressant d'analyser les autres voies métaboliques altérées en réponse au kétoprofène, puisque cette étude s'est principalement intéressée aux voies métaboliques précédemment identifiées comme étant significativement altérées en réponse à l'indométacine.

Afin d'approfondir l'investigation dans le but de mieux comprendre la distinction entre les deux groupes de réponse, répondeurs et non-répondeurs, un dosage par ELISA des prostaglandines PGE2 pourrait être effectué pour confirmer la stratégie de distinction des groupes. En outre, le dosage des leucotriènes, par un ELISA pour la LTB4, pourrait aussi permettre de confirmer le rôle de double inhibiteur des enzymes COX et LOX du kétoprofène. De plus, pour déterminer les effets réels du sulfure d'hydrogène sur la muqueuse intestinale immature humaine, la culture des explants pourrait être effectuée dans une phase gazeuse enrichie en H₂S, permettant de mieux apprécier les effets bénéfiques du sulfure d'hydrogène.

Finalement, cette étude a aussi permis de mettre en lumière l'importance d'une normalisation adaptée pour chaque analyse de RT-qPCR plutôt que l'utilisation de gènes de référence communs «prévalidés».

LISTE DES PUBLICATIONS

Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 64(15):5245-50.

Antonucci R, Zaffanello M, Elisabetta P, Porcella A, Cuzzolin L, Pilloni MD, Fanos V (2012) Use of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs in Pregnancy : Impact on the Fetus and Newborn. *Curr Drug Metab* 13(4):474-90.

Basivireddy J, Vasudevan A, Jacob M, Balasubramanian KA (2002) Indomethacin-induced mitochondrial dysfunction and oxidative stress in villus enterocytes. *Biochem Pharmacol* 64(2):339-49.

Bell MJ, Ternberg JL, Feigin RD, Keating JP, Marshall R, Barton L, Brotherthorn T: (1978) Neonatal necrotizing enterocolitis: Therapeutic Decisions Based upon Clinical Staging. *Ann Surg* 187(1):1-7.

Berkman ND, Thorp JM, Lohr KN, Cary TS, Hartmann KE, Gavin NI, Hasselblad V, Idicula AE (2003) Tocolytic treatment for the management of preterm labor: A review of the evidence. *Am J Obstet Gynecol* 188(6):1648-59.

Breganó JW, Barbosa DS, El Kadri MZ, Rodrigues MA, Cecchini R, Dichi I (2014) Comparison of selective and non selective cyclo-oxygenase 2 inhibitors in experimental colitis exacerbation: role of leukotriene B4 and superoxide dismutase. *Arq Gastroenterol* 51(3):226-34.

Cabré F, Fernández F, Zapatero MI, Araño A, García ML, Mauleón D (1998) Intestinal ulcerogenic effect of S(+)-ketoprofen in the rat. *J Clin Pharmacol* 38(12 Suppl):27S-32S.

Caliendo G, Cirino G, Santagada V, Wallace JL (2010) Synthesis and biological effects of hydrogen sulfide (H₂S): development of H₂S-releasing drugs as pharmaceuticals. *J Med Chem* 53(17):6275-86.

Caplan M (2014) Necrotizing Enterocolitis in Preterm Infants is Related to Enteral Feeding, But the Mechanisms Remain Uncertain and Have Changed Over Time. *Curr Pediatr Rep* 2:241-47.

Caradec J, Sirab N, Keumeugni C, Moutereau S, Chimingqi M, Matar C, Revaud D, Bah M, Manivet P, Conti M, Loric S (2010) 'Desperate house genes': the dramatic example of hypoxia. *Br J Cancer* 102(6): 1037-43.

- Cheng YT, Wu SL, Ho CY, Huang SM, Cheng CL, Yen GC (2014) Beneficial effects of Camellia Oil (*Camellia oleifera* Abel.) on ketoprofen-induced gastrointestinal mucosal damage through upregulation of HO-1 and VEGF. *J Agric Food Chem* 62(3):642-50.
- Cho SX, Berger PJ, Nold-Petry CA, Nold MF (2016) The immunological landscape in necrotising enterocolitis. *Expert Rev Mol Med* 18: e12.
- Choi YY (2014) Necrotizing enterocolitis in newborns: update in pathophysiology and newly emerging therapeutic strategies. *Korean J Pediatr* 57(12): 505–513.
- Claud E (2010) Neonatal Necrotizing Enterocolitis – Inflammation and Intestinal Immaturity. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem* 8(3): 248–259.
- Coleman JW (2001) Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int Immunopharmacol* 1(8):1397-406.
- Dani C (2011) New therapeutic strategies for the treatment of patent ductus arteriosus in preterm infants. *J Matern Fetal Neonatal Med* 24 Suppl 3:5-6.
- Davies NM, Roseth AG, Appleyard CB, McKnight W, Del Soldato P, Calignano A, Cirino G, Wallace JL (1997) NO-naproxen vs. naproxen: ulcerogenic, analgesic and anti-inflammatory effects. *Aliment Pharmacol Ther* 11(1):69-79.
- de la Lastra CA, Nieto A, Motilva V, Martín MJ, Herrerías JM, Cabré F, Mauleón D (2000) Intestinal toxicity of ketoprofen-trometamol vs its enantiomers in rat: Role of oxidative stress. *Inflamm Res* 49(11):627-32.
- Dheda K, Huggett JF, Chang JS, Kim LU, Bustin SA, Johnson MA, Rook GA, Zumla A (2005) The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization. *Anal Biochem* 344(1):141-3.
- Dice JE, Bhatia J (2007) Patent Ductus Arteriosus: An Overview. *J Pediatr Pharmacol Ther* 12(3): 138–146.
- Dydensborg AB, Herring E, Auclair J, Tremblay E, Beaulieu JF (2006) Normalizing genes for quantitative RT-PCR in differentiating human intestinal epithelial cells and adenocarcinomas of the colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290(5):G1067-74.
- Ferretti E, Tremblay E, Thibault MP, Beaulieu JF (*En préparation*) Comparative effects between ibuprofen and indomethacin in the mid-gestation human intestine.
- Fiorucci S, Antonelli E, Distrutti E, Rizzo G, Mencarelli A, Orlandi S, Zanardo R, Renga B, Di Sante M, Morelli A, Cirino G, Wallace JL (2005) Inhibition of hydrogen sulfide generation contributes to gastric injury caused by anti-inflammatory nonsteroidal drugs. *Gastroenterology* 129(4):1210-24.

Fiorucci S, Orlandi S, Mencarelli A, Caliendo G, Santagada V, Distrutti E, Santucci L, Cirino G, Wallace JL (2007) Enhanced activity of a hydrogen sulfide-releasing derivative of mesalamine (ATB-429) in a mouse model of colitis. *Br J Pharmacol* 150: 996–1002.

Fujii AM, Brown E, Mirochnick M, O'Brien S, Kaufman G (2002) Neonatal necrotizing enterocolitis with intestinal perforation in extremely premature infants receiving early indomethacin treatment for patent ductus arteriosus. *J Perinatol* 22(7):535-40.

Fukai T, Ushio-Fukai M (2011) Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal* 15(6):1583-606.

Gassler N, Rohr C, Schneider A, Kartenbeck J, Bach A, Obermüller N, Otto HF, Autschbach F (2001) Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281(1):G216–28.

Gemici B, Elsheikh W, Feitosa KB, Costa SK, Muscara MN, Wallace JL (2015) H₂S-releasing drugs: anti-inflammatory, cytoprotective and chemopreventative potential. *Nitric Oxide* 46:25-31.

Gephart SM, McGrath JM, Effken JA, Halpern MD (2012) Necrotizing Enterocolitis Risk; State of the Science. *Adv Neonatal Care* 12(2): 77–89.

Główka F, Karaźniewicz-Lada M, Grześkowiak E, Rogozinska D, Romanowski W (2011) Clinical pharmacokinetics of ketoprofen enantiomers in wild type of Cyp 2c8 and Cyp 2c9 patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 36(3): 167–173.

Gordon PV (2009) Understanding Intestinal Vulnerability to Perforation in the Extremely Low Birth Weight Infant. *Pediatr Res* 65(2):138-44.

Gordon PV, Swanson JR (2014) Necrotizing enterocolitis is one disease with many origins and potential means of prevention. *Pathophysiology* 21(1):13-9.

Grasberger H, El-Zaatari M, Merchant JL (2013) Dual Oxidases Control Release of Hydrogen Peroxide by the Gastric Epithelium to Prevent *Helicobacter felis* Infection and Inflammation in Mice. *Gastroenterology* 145(5):1045–1054.

Grosfeld JL, Chaet M, Molinari F, Engle W, Engum SA, West KW, Rescorla FJ Scherer 3rd (1996) Increased risk of necrotizing enterocolitis in premature infants with patent ductus arteriosus treated with indomethacin. *Ann Surg* 224(3): 350–357.

Gu X, Zhu YZ (2011) Therapeutic applications of organosulfur compounds as novel hydrogen sulfide donors and/or mediators. *Expert Rev Clin Pharmacol* 4(1):123-33.

Guthrie SO, Gordon PV, Thomas V, Thorp JA, Peabody J, Clark RH (2003) Necrotizing enterocolitis among neonates in the United States. *J Perinatol* 23(4):278-85.

- Hammers AL, Sanchez-Ramos L, Kaunitz AM (2015) Antenatal exposure to indomethacin increases the risk of severe intraventricular hemorrhage, necrotizing enterocolitis, and periventricular leukomalacia: a systematic review with metaanalysis. *Am J Obstet Gynecol* 212(4):505.
- Hedi H, Norbert G (2004) 5-Lipoxygenase Pathway, Dendritic Cells, and Adaptive Immunity. *J Biomed Biotechnol* (2):99–105.
- Henry MC, Moss RL (2009) Necrotizing enterocolitis. *Annu Rev Med* 60:111-24.
- Holzer P, Jovic M, Cabré F, Mauléon D (2001) Estimation of acute flurbiprofen and ketoprofen toxicity in rat gastric mucosa at therapy-relevant doses. *Inflamm Res* 50(12):602-8.
- Howdle PD (1983) Organ culture in the study of the gastrointestinal tract in health and disease. *Clin Sci* 65:105-10.
- Kokki H (2010) Ketoprofen Pharmacokinetics, Efficacy, and Tolerability in Pediatric Patients. *Paediatr Drugs* 12(5):313-29.
- Kozera B, Rapacz M (2013) Reference genes in real-time PCR. *J Appl Genet* 54(4):391-406.
- Krzystek-Korpacz M, Diakowska D, Bania J, Gamian A (2014) Expression stability of common housekeeping genes is differently affected by bowel inflammation and cancer: implications for finding suitable normalizers for inflammatory bowel disease studies. *Inflamm Bowel Dis* 20(7):1147-56.
- Li L, Rose P, Moore PK (2011) Hydrogen sulfide and cell signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 51:169-87.
- Li L, Rossoni G, Sparatore A, Lee LC, Del Soldato P, Moore PK (2007) Anti-inflammatory and gastrointestinal effects of a novel diclofenac derivative. *Free Radic Biol Med* 42(5):706-19.
- Llanas B, Cavert MH, Apere H, Demarquez JL (1996) Les effets secondaires du kétoprofène après exposition intra-utérine. Intérêt du dosage plasmatique. *Arch de Ped* 3(3):248-53.
- MacNaughton WK, Cirino G, Wallace JL (1989) Endothelium-derived relaxing factor (nitric oxide) has protective actions in the stomach. *Life Sci* 45(20):1869-76.
- Maheshwari A, Kurundkar AR, Shaik SS, Kelly DR, Hartman Y, Zhang W, Dimmitt R, Saeed S, Randolph DA, Aprahamian C, Datta G, Ohls RK (2009) Epithelial cells in fetal intestine produce chemerin to recruit macrophages. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 297(1):G1-G10.

Ménard D, Arsenault P (1985) Explant culture of human fetal small intestine. *Gastroenterology* 88(3):691-700.

Ménard D, Arsenault P, Pothier P (1988) Biologic effects of epidermal growth factor in human fetal jejunum. *Gastroenterology* 94(3):656-63.

Ménard D, Corriveau L, Arsenault P (1990) Differential effects of epidermal growth factor and hydrocortisone in human fetal colon. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 10(1):13-20.

Ménard D, Tremblay E, Ferretti E, Babakissa C, Perron N, Seidman EG, Levy E, Beaulieu JF (2012) Anti-inflammatory effects of epidermal growth factor on the immature human intestine. *Physiol Genomics* 44(4):268-80.

Mizrahi A, Barlow O, Berdon W, Blanc WA, Silverman WA (1965) Necrotizing Enterocolitis in Premature Infants. *J Pediatr* 66:697-705.

Musch MW, Walsh-Reitz MM, Chang EB (2006) Roles of ZO-1, occludin, and actin in oxidant-induced barrier disruption. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290:G222e31.

Neu J (1996) Necrotizing enterocolitis: The Search for a Unifying Pathogenic Theory Leading to Prevention. *Pediatr Clin North Am* 43(2):409-432.

Niemarkt HJ, de Meij TG, van de Velde ME, van der Schee MP, van Goudoever JB, Kramer BW, Andriessen P, de Boer NK (2015) Necrotizing enterocolitis: a clinical review on diagnostic biomarkers and the role of the intestinal microbiota. *Inflamm Bowel Dis* 21(2):436-44.

Nolan T, Hands RE, Bustin SA (2006) Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc* 1(3):1559-82.

Patel B, Shah J (2012) Necrotizing Enterocolitis in Very Low Birth Weight Infants: A Systemic Review. *ISRN Gastroenterol* 2012:562594.

Peng S, Duggan A (2005) Gastrointestinal adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Expert Opin Drug Saf* 4(2):157-69.

Perron N, Tremblay E, Ferretti E, Babakissa C, Seidmand EG, Levy E, Ménard D, Beaulieu JF (2013) Deleterious effects of indomethacin in the mid-gestation human intestine. *Genomics* 101(3):171-7.

Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29(9):e45.

Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* 26(6):509-15.

Pierro A, Hall N (2003) Surgical treatment of infants with necrotizing enterocolitis. *Semin Neonatol* 8(3):223-32.

Pollard T, Earnshaw W (2002) Second messengers. *Cell biology*. Philadelphia: Saunders an Imprint of Elsevier Science (1st ed.), 430-431.

Rees CM, Pierro A, Eaton S (2007) Neurodevelopmental outcomes of neonates with medically and surgically treated necrotizing enterocolitis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 92(3):F193–F198.

Sharma R, Hudak ML, Tepas JJ^{3rd}, Wludyka PS, Teng RJ, Hastings LK, Renfro WH, Marvin WJ Jr. (2010) Prenatal or postnatal indomethacin exposure and neonatal gut injury associated with isolated intestinal perforation and necrotizing enterocolitis. *J Perinatol* 30(12):786-93.

Silver N, Best S, Jiang J, Thein SL (2006) Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Mol Biol* 7:33.

Sinatra RS, de Leon-Casasola OA, Ginsberg B, Viscusi ER (2009) NSAIDs and Acetaminophen: Pharmacology for the Future. *Acute pain management*. New-York: Cambridge University Press (1st ed.), 55.

Taylor S, Wakem M, Dijkman G, Alsarraj M, Nguyen M (2010) A practical approach to RT-qPCR-Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods* 50(4):S1-5.

Thummel KE (2007) Gut instincts: CYP3A4 and intestinal drug metabolism. *J Clin Invest* 117(11): 3173–3176.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3(7):RESEARCH0034.

Van Overmeire B, Chemtob S (2005) The pharmacologic closure of the patent ductus arteriosus. *Semin Fetal Neonatal Med* 10(2):177-84.

Wallace JL (2010) Physiological and pathophysiological roles of hydrogen sulfide in the gastrointestinal tract. *Antioxid Redox Signal* 12(9):1125-33.

Wallace JL, Caliendo G, Santagada V, Cirino G, Fiorucci S (2007) Gastrointestinal safety and anti-inflammatory effects of a hydrogen sulfide-releasing diclofenac derivative in the rat. *Gastroenterology* 132(1):261-71.

Wallace JL, Cirino G, Santagada V, Caliendo G (2008) Hydrogen sulfide derivatives of nonsteroidal anti-inflammatory drugs, United States Patent Application No. WO/2008/009127.

Wallace JL, Reuter BK, Cicala C, McKnight W, Grisham MB, Cirino G (1994) Novel nonsteroidal anti-inflammatory drug derivatives with markedly reduced ulcerogenic properties in the rat. *Gastroenterology* 107(1):173-9.

Wallace JL, Reuter BK, Cirino G (1994) Nitric oxide-releasing non-steroidal anti-inflammatory drugs: a novel approach for reducing gastrointestinal toxicity. *J Gastroenterol Hepatol* 9 Suppl 1:S40-4.

Whittle BJR, Boughton-Smith NK, Moncada S (1992) Biosynthesis and role of the endothelium-derived vasodilator, nitric oxide, in the gastric mucosa. *Ann N Y Acad Sci* 664:126-39.

Xie F, Xiao P, Chen D, Xu L, Zhang B (2012) miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Mol Biol* 80(1):75-84.

ANNEXE I

1- Liste des publications de l'étudiante

Ferretti E, Tremblay E, Thibault MP, Grynspan D, Burghardt K, Bettolli M, Babakissa C, Levy E, Beaulieu JF (2016) The nitric oxide synthase 2 pathway is targeted by both pro- and anti-inflammatory treatments in the immature human intestine. *Nitric oxide (In press)*

Ferretti E, Tremblay E, Thibault MP, Beaulieu JF (*En préparation*) Comparative effects between ibuprofen and indomethacin in the mid-gestation human intestine.

Lepage M, Thibault MP, Beaulieu JF (*En preparation*) Knockdown of laminin $\alpha 5$ chain (LAMA5) stimulates intestinal absorptive cell differentiation.

Thibault MP, Tremblay E, Wallace JL, Beaulieu JF (*En préparation*) Effects of ketoprofen and its hydrogen sulfide-releasing derivative on the immature human intestine.

Tremblay É, Thibault MP, Ferretti E, Babakissa C, Bertelle V, Bettolli M, Burghardt KM, Colombani JF, Grynspan D, Levy E, Lu P, Mayer S, Ménard D, Mouterde O, Renes IB, Seidman EG, Beaulieu JF (2016) Gene expression profiling in necrotizing enterocolitis reveals pathways common to those reported in Crohn's disease. *BMC Med Genomics* 9(1):6.

2- Liste des communications de l'étudiante

Club de Recherches Cliniques du Québec (CRCQ), Septembre 2016, Lac-Delage, Québec, Canada; Thibault MP, Tremblay E, Wallace JL, Beaulieu JF (2016) L'impact du kétoprofène et de son dérivé lié à l'H₂S sur la muqueuse intestinale immature humaine.

Canadian digestive diseases week (CDDW), Mars 2017, Banff, Alberta, Canada; Thibault MP, Tremblay E, Wallace JL, Beaulieu JF (2017) Effects of ketoprofen and its hydrogen sulfide-releasing derivative on the immature human intestine.

ANNEXE II

Ingenuity pathway analysis des fonctions cellulaires, moléculaires et physiologiques modulées par l'indométacine sur la muqueuse intestinale immature humaine (Perron et *al.*, 2013).

